

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2023 - Thèse n° 052

**LE PORC COMME MODELE PRECLINIQUE IMMUNOLOGIQUE.
L'ÉVALUATION DU POTENTIEL IMMUNOLOGIQUE DANS LE SEPSIS.**

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 6 octobre 2023
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

BESSON Eloïse

CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON

Année 2023 - Thèse n° 052

LE PORC COMME MODELE PRECLINIQUE IMMUNOLOGIQUE. L'ÉVALUATION DU POTENTIEL IMMUNOLOGIQUE DANS LE SEPSIS.

THESE

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 6 octobre 2023
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

BESSON Eloïse

Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (20/03/2022)

Pr	ABITBOL	Marie	Professeur
Dr	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Pr	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Dr	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Pr	BECKER	Claire	Professeur
Dr	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Dr	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
Pr	BENOIT	Etienne	Professeur
Pr	BERNY	Philippe	Professeur
Pr	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
Dr	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
Dr	BRUTO	Maxime	Maître de conférences
Dr	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
Pr	BUFF	Samuel	Professeur
Pr	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
Dr	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
Pr	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Pr	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
Pr	CHABANNE	Luc	Professeur
Pr	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
Dr	CHANOIT	Guillaume	Professeur
Dr	CHETOT	Thomas	Maître de conférences
Pr	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Professeur
Pr	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Pr	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Dr	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
Dr	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
Dr	GALIA	Wessam	Maître de conférences
Pr	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
Dr	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Dr	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Dr	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Dr	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
Pr	JUNOT	Stéphane	Professeur
Pr	KODJO	Angeli	Professeur
Dr	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Dr	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Dr	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Pr	LE GRAND	Dominique	Professeur
Pr	LEBLOND	Agnès	Professeur
Dr	LEDOUX	Dorothee	Maître de conférences
Dr	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Dr	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences

Dr LEGROS	Vincent	Maître de conférences
Pr LEPAGE	Olivier	Professeur
Pr LOUZIER	Vanessa	Professeur
Dr LURIER	Thibaut	Maître de conférences
Dr MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences
Pr MARCHAL	Thierry	Professeur
Dr MOSCA	Marion	Maître de conférences
Pr MOUNIER	Luc	Professeur
Dr PEROZ	Carole	Maître de conférences
Pr PIN	Didier	Professeur
Pr PONCE	Frédérique	Professeur
Pr PORTIER	Karine	Professeur
Pr POUZOT-NEVORET	Céline	Professeur
Pr PROUILLAC	Caroline	Professeur
Pr REMY	Denise	Professeur
Dr RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
Pr ROGER	Thierry	Professeur
Dr SAWAYA	Serge	Maître de conférences
Pr SCHRAMME	Michael	Professeur
Pr SERGENTET	Delphine	Professeur
Dr TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Dr VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
Dr VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	Chargé d'enseignement contractuel
Pr ZENNER	Lionel	Professeur

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Bernard Allaouchiche,

De l'université de Lyon, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Réanimation Médicale

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ma thèse,

Mes hommages respectueux.

A Madame le Docteur Tatiana Victoni,

De Vetagro Sup, campus vétérinaire de Lyon,

Pour votre aide plus que précieuse et votre encadrement,

Pour votre patience, votre disponibilité et votre gentillesse.

Mes sincères remerciements.

A Madame le Docteur Carole Peroz,

De Vetagro Sup, campus vétérinaire de Lyon,

Pour m'avoir fait l'honneur de faire partie du jury de ma thèse,

Mes hommages respectueux.

TABLE DES MATIERES

Table des annexes	11
Table des figures.....	13
Table des tableaux.....	15
Liste des abréviations.....	17
Introduction.....	19
<i>Première partie : Étude bibliographique.....</i>	<i>21</i>
I. L'utilisation des animaux à des fins scientifiques : de l'Antiquité à nos jours.....	23
1. Les animaux et les sciences dans l'Histoire	23
2. L'essor de l'utilisation animale et la naissance du concept d'anatomie comparée	23
3. Le questionnement éthique entourant ces expériences.....	26
4. Le cadre réglementaire : la question du statut légal de l'animal	27
4.1. L'évolution du statut de l'animal dans les textes de loi	27
4.2. L'avenir de l'expérimentation animale	28
II. L'utilisation du porc dans la recherche	30
1. Caractéristiques biologiques du porc (<i>Sus scrofa domestica</i>)	32
1. Similarités entre le porc et l'homme	33
1.1. Génome.....	33
1.2. Organes lymphoïdes.....	34
1.3. Le coeur.....	36
i. Similitudes entre les cœurs porcin et humain.....	38
ii. Intérêts et perspectives de l'utilisation du porc comme modèle en cardiologie.....	43
1.4. Le foie.....	44
i. Anatomie et histologie comparées	44
ii. Intérêts et perspectives de l'utilisation du porc comme modèle en hépatologie	46
1.5. Les poumons	47
i. Anatomie et histologie comparées	47
ii. Immunologie pulmonaire.....	51
iii. Intérêts et perspectives de l'utilisation du porc comme modèle en pneumologie	53
2. Le système immunitaire. L'intérêt du porc comme modèle pré-clinique immunologique	53
2.1. Présentation succincte du système immunitaire	53
2.2. Les macrophages.....	54

i.	Découverte historique des macrophages	54
ii.	Description morphologique	55
iii.	Origine et devenir des macrophages	56
iv.	Les sous-types de monocytes.....	57
v.	Principes d'activation et de polarisation des macrophages.....	58
vi.	Rôle des macrophages	63
vii.	Intérêt de l'utilisation du porc comme modèle pré-clinique en immunologie	66
3.	Bilan : caractéristiques communes entre l'Homme et le porc	67
 Deuxième partie : Étude expérimentale		69
I.	Etude du profil des macrophages dans un modèle porcin de choc septique	71
1.	Le sepsis	71
1.1.	Epidémiologie.....	71
1.2.	Définition et étiologie.....	71
1.3.	Symptômes.....	74
1.4.	Physiopathogénie.....	75
2.	Les objectifs	78
3.	Matériel et méthodes	80
3.1.	Ethique	80
3.2.	Calcul de la taille de l'échantillon	80
3.3.	Animaux	80
3.4.	Equipement et anesthésie.....	80
3.5.	Protocole expérimental.....	81
3.6.	Préparation de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	82
3.7.	Traitement et analyse des échantillons.....	82
i.	Inclusion des tissus en paraffine	82
ii.	Confection des coupes	82
iii.	Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES).....	82
iv.	Protocole d'immunohistochimie (IHC) pour le marquage spécifique des macrophages M1 et M2 chez le porc (Ac anti-CD14, CD68, CD86, CD163 et CD206).....	83
500-6074.....		83
v.	Protocole Multiplex pour le co-marquage CD14/CD163.....	83
3.8.	Traitement des images.....	85

3.9. Analyses statistiques	85
4. Résultats	86
4.1. Analyses histologiques.....	86
i. Lésions de l'arbre respiratoire associées au choc septique chez le porc.....	86
ii. Lésions hépatiques associées au choc septique chez le porc	87
4.2. Immunohistochimie	89
i. Marquage des macrophages tissulaires et des macrophages de type M1 : utilisation des anticorps anti-CD68 et anti-CD86	89
ii. Quantification des macrophages M1	93
iii. Marquage des macrophages M2 : utilisation d'anticorps anti-CD206.....	96
iv. Quantification des macrophages M2	97
5. Discussion	99
6. Perspectives	103
Conclusion	105
Bibliographie	107
Annexes	115

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Poster pédagogique visant à réduire la prévalence du choc septique par sensibilisation des populations. Présentation des populations à risque.....	115
Annexe 2 : Poster pédagogique visant à réduire la prévalence du choc septique par sensibilisation des populations. Conseils pour la prévention des infections.....	116
Annexe 3 : Protocole d'utilisation du logiciel Qupath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées.....	117
Annexe 4 : Figures supplémentaires.....	131

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Porc préparé pour une séance de vivisection.....	24
Figure 2 : Extrait de planche d'anatomie comparée	25
Figure 3 : Nombre de publications associées à la recherche du mot-clé « pig » sur PubMed par année.	31
Figure 4 : Principales espèces animales utilisées pour la recherche en 2021 et nombres d'utilisations associés à chaque espèce.	32
Figure 5 : Quelques races porcines parmi les plus utilisées dans la recherche et poids moyen des individus.....	33
Figure 6 : Organisation schématique des noeuds lymphatiques humain et porcine.	36
Figure 7 : Comparaison morphologique des coeurs porcine et humaine.....	38
Figure 8 : Radiographies thoraciques et orientation cardiaque chez l'Homme (A) et le porc (B).....	39
Figure 9 : Comparaison de l'organisation des veines caves chez le porc (A) et l'Homme (B)..	40
Figure 10 : Réseau coronarien porcine et mise en évidence de la dominance coronarienne droite.	41
Figure 11 : Etude morphologique de la surface droite du coeur porcine et mise en évidence de la veine azygos (AV) spécifique du porc.....	42
Figure 12 : Dissection du ventricule droit d'un coeur de porc	43
Figure 13 : Anatomie comparée entre le foie du porc (A) et de l'Homme (B).....	45
Figure 14 : Parenchyme hépatique de (A) porc ; (B) humaine coloré au HES	45
Figure 15 : Parenchyme hépatique de (A) porc ; (B) humaine coloré au HES	46
Figure 16 : Anatomie pulmonaire porcine.	48
Figure 17 : Représentation schématique de la division bronchique (a) monopodiale chez le porc VS (b) bipodiale chez l'Homme.....	49
Figure 18 : Histologie pulmonaire comparée entre le porc (A) et l'Homme (B).....	50
Figure 19 : Histologie pulmonaire comparée entre le porc (A) et l'Homme (B), focus sur les structures composant une paroi bronchique.....	51
Figure 20 : Population cellulaire du système phagocytaire mononucléé pulmonaire.....	51
Figure 21 : Micrographie électronique pulmonaire d'agneau.....	52
Figure 22 : Portraits d'Elie Metchnikoff et de Paul Ehrlich, pères des immunités cellulaire et humorale	55
Figure 23 : Variations morphologiques des macrophages selon leur localisation	56
Figure 24 : Voies de différenciations des cellules souches hématopoïétiques	57
Figure 25 : Les différents sous-types de monocytes décrits chez l'homme	58
Figure 26 : Différents états de polarisation des macrophages : voies d'activation, produits de sécrétions et rôles.....	60
Figure 27 : Morphologie des macrophages selon l'environnement de maturation.....	61
Figure 28 : Images en microscopie électronique d'un macrophage phagocytant <i>Haemophilus Influenzae</i>	65

Figure 29 : Présentation du score SOFA, utilisé pour évaluer la dysfonction multi-organique chez les patients suspects ou atteints de sepsis	73
Figure 30 : Exemples de symptômes pouvant être liés au sepsis chez l'homme	74
Figure 31 : Exemples de symptômes observés chez les patients ayant été traités pour sepsis	75
Figure 32 : Variations dans les réponses pro et anti-inflammatoires du système immunitaire au cours de l'évolution du sepsis et du choc septique	76
Figure 33 : Physiopathologie du sepsis résumée	77
Figure 34 : Principe et mécanismes du protocole de marquage Multiplex	84
Figure 35 : Parenchyme pulmonaire de porc coloré au HES.....	86
Figure 36 : Parenchyme pulmonaire de porc coloré au HES.....	87
Figure 37 : Parenchyme hépatique de porc coloré au HES.....	88
Figure 38 : Parenchyme pulmonaire de porc coloré au HES et marqué à l'anticorps anti-CD86 dilué au (A et B) 1:50 ; (C et D) 1:250	89
Figure 39 : Parenchyme pulmonaire (A, B, C et D) de porc ; (E et F) d'humain coloré au HES et marqué à l'anticorps anti-CD86 (2 anticorps a et b ont été testés) dilué au 1:50.....	90
Figure 40 : Parenchyme pulmonaire (A, B, C et D) de porc et (E et F) d'humain marqué à l'anticorps anti-CD14.....	91
Figure 41 : Parenchyme pulmonaire (A, B, C et D) de porc et (E et F) d'humain coloré au HES et marqué à l'anticorps anti-CD163	93
Figure 42 : Nombre de cellules marquées CD14 ⁺ par mm ² sur les échantillons de tissus pulmonaires de porcs du groupe contrôle (basal) et soumis à un choc septique (choc).....	94
Figure 43 : Nombre de cellules marquées CD163 ⁺ par mm ² sur les échantillons de tissus pulmonaires de porcs du groupe contrôle (basal) et soumis à un choc septique (choc)	94
Figure 44 : Parenchyme pulmonaire de porc co-marqué par les anticorps anti-CD14 et anti-CD163 par le protocole Multiplex	95
Figure 45 : Principe de détection cellulaire et de reconnaissance des marqueurs cellulaires.	95
Figure 46 : Nombre de cellules co-marquées CD14 ⁺ CD163 ⁺ par mm ² sur les échantillons de tissus pulmonaires de porcs du groupe contrôle (basal) et soumis à un choc septique (choc)	96
Figure 47 : Parenchyme pulmonaire (A, B, C et D) de porc et (E, F) d'humain coloré au HES et marqué à l'anticorps anti-CD206	97
Figure 48 : Nombre de cellules marquées CD206 par mm ² sur les échantillons de tissus pulmonaires de porcs du contrôle (basal) et soumis à un choc septique (choc).....	98

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Variation du rapport R (%) du poids du cœur/poids du corps selon les espèces animales.....	37
Tableau II : Présence ou non des CD d'intérêts, considérés comme marqueurs des macrophages M1 de l'Homme, chez le porc et le souris selon la littérature actuelle.....	59
Tableau III : Présence ou non des CD d'intérêts, considérés comme marqueurs des macrophages M2 de l'Homme, chez le porc et la souris selon la littérature actuelle.....	60
Tableau IV : Principales caractéristiques des états de polarisation des macrophages.....	61
Tableau V : Principales similitudes et différences entre l'Homme et le porc concernant les différents organes/entité d'intérêts.....	66
Tableau VI : Anticorps utilisés pour l'identification des macrophages chez le porc par immunohistochimie.....	81

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac = anticorps
Ao = Aorte
AV = *azygos vein* = veine azygos
Bpm = battements par minute
CD = Cluster de Différenciation
CLP = *common lymphoid progenitor*
CMH = Complexe majeur d'histocompatibilité
CMP = *common myeloid-erythroid progenitor*
CPA = Cellule présentatrice d'antigène
CS = *cylindrical coronary sinus* = sinus coronaire
CxB = *circumflex branch* = branche circonflexe
DAMP = *damage-associated molecular pattern* = motif moléculaire associé aux dégâts
DC = débit cardiaque
FC = fréquence cardiaque
FGF = *fibroblast growth factor*
Gb = giga-bases
GCV = *great cardiac vein*
GM-CSF = *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
HES = Hématoxyline-Eosine-Safran
HEV = *high endothelium veinule* = veinule à endothélium épais
HLA-DR = *human leukocyte antigen-D*
HSC = *hematopoietic stem cell* = cellule souche hématopoïétique
IDO = indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN = interféron
Ig = immunoglobuline
IHC = immunohistochimie
IL = interleukine
iNOS = *inducible nitric oxide synthase*
LPS = lipopolysaccharide
LPV = *left posterior vein* = veine postérieure gauche
LV = *left ventricle* = ventricule gauche
M1 = macrophage M1
M2 = macrophage M2
MCSF = *macrophage colony-stimulating factor*
MCV = *middle cardiac vein*
MIP = macrophage intravasculaire pulmonaire
Mpm = mouvements par minute
NK = *natural killer*
OMS = Organisation Mondiale de la Santé
PAD = pression artérielle diastolique

PAM = pression artérielle moyenne

PAMP = *pathogen-associated molecular pattern* = motif moléculaire associé aux pathogènes

PAPS = pression artérielle pulmonaire systolique

PAS = pression artérielle systolique

PICS = *persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome*

PRR = *pattern recognition receptor*

PSS = *post sepsis syndrom*

RA = *right atrium* = atrium droit

RAA = *right atrial appendage* = auricule droit

RV = *right ventricle* = ventricule droit

SCV = *superior caval vein* = veine cave supérieure

TGF = *transforming growth factor*

TLR = *toll-like receptor*

TNF = *tumor necrosis factor*

VPP = variation de la pression pulsée

INTRODUCTION

La souris est aujourd'hui le modèle animal le plus utilisé par les chercheurs. Néanmoins, la transposition des thérapies mises au point chez la souris vers des essais cliniques chez l'Homme se traduit par de nombreux échecs, soulignant l'intérêt de recourir à des modèles animaux complémentaires. Ces dernières années, une utilisation croissante de modèles porcins est observée en lien avec les similitudes physiologiques, métaboliques et immunologiques entre l'Homme et le porc. Un exemple de ces similarités immunologiques concerne les macrophages, acteurs clés dans la physiopathologie de nombreuses affections, dont le sepsis chez l'Homme et chez les animaux.

Le sepsis est un problème de santé majeur, comme défini par l'OMS, et est au cœur de nombreuses études destinées à améliorer la compréhension des mécanismes mis en jeu. Ces études comportent généralement une partie d'étude préclinique utilisant des animaux. Toutefois, les connaissances immunologiques du porc sont moins étendues dans la littérature que celles de la souris, ce qui freine quelque peu l'utilisation de cette espèce.

Les macrophages régulent la réponse immunitaire de l'hôte par leur polarisation vers différents phénotypes fonctionnels (pro et anti-inflammatoire), et le dysfonctionnement de cette réponse immunitaire est l'un des mécanismes qui sous-tendent l'apparition et le développement du sepsis. Étudier l'évolution des phénotypes des macrophages lors du choc septique pourrait contribuer à améliorer la compréhension des mécanismes inflammatoires mis en jeu et celle du concept d'immunoparalysie. Ce travail de thèse vise à mettre en évidence l'existence de sous-populations de macrophages pulmonaires chez le porc.

Dans la première partie de ce manuscrit, bibliographique, nous avons réalisé un état des lieux de l'utilisation des animaux dans la recherche. Puis, nous avons présenté les similitudes anatomiques, physiologiques et immunologiques existantes entre l'Homme et le porc.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, expérimentale, après un bref rappel des caractéristiques du sepsis et du choc septique, nous avons confirmé les altérations pulmonaires et hépatiques dans un modèle de choc septique porcine. Ensuite, nous avons évalué les différents marqueurs des macrophages pro et anti-inflammatoires décrits chez l'Homme et chez le porc. Enfin, nous avons discuté nos résultats à la lumière des connaissances actuelles sur l'immunologie porcine.

L'équipe APCSE (Agressions Pulmonaires et Circulatoires dans le Sepsis), avec laquelle j'ai effectué cette étude, étant constituée de médecins anesthésistes-réanimateurs, ces résultats pourront être validés avec des échantillons humains, favorisant ainsi la recherche translationnelle et l'approche Global Health.

Première partie :

Étude bibliographique

I. L'utilisation des animaux à des fins scientifiques : de l'Antiquité à nos jours

1. Les animaux et les sciences dans l'Histoire

Le concept d'utilisation des animaux à des fins scientifiques, que ce soit en les disséquant ou en les incluant dans des expériences, est loin d'être récent. Depuis l'Antiquité grecque, des philosophes, des médecins et leurs disciples s'adonnèrent à cette activité. Pour n'en citer que quelques-uns : Alcmeon de Croton (Ve siècle av. J.-C.), Anaxagore de Clazomènes (Ve siècle av. J.-C.) ou encore Aristote sont connus pour leurs travaux de dissection et d'observation. Aristote regroupe ses observations dans des ouvrages accompagnés de planches anatomiques tels que *Histoire des Animaux* (Aristote 343apr. J.-C.) ou *Génération des Animaux* (Aristote 330apr. J.-C.) De telles pratiques sont également réalisées dans les écoles des illustres Hippocrate, Galien ou encore celle d'Alexandrie. Au Moyen Age, peu d'expériences sont réalisées. On se contentait de se référer aux travaux d'Aristote et de Galien. Nous pouvons donc considérer que de l'Antiquité jusqu'au XVI^e siècle, l'utilisation des animaux à des fins scientifiques existe mais reste rare et timide. On pourrait citer comme exceptions à cette règle l'école de Galien (citée plus haut) ainsi que l'école de médecine de Salerne au XII^e siècle où l'on enseignait l'anatomie à partir d'observations faites sur les animaux (Chapouthier 1998).

2. L'essor de l'utilisation animale et la naissance du concept d'anatomie comparée

Il est important de noter que les expériences réalisées de l'Antiquité au XVI^e siècle ne relèvent pas de ce que l'on considère aujourd'hui comme de l'expérimentation animale. Il s'agit plutôt de simples observations des corps et des organes dans un but descriptif ou religieux (on pensait trouver dans les entrailles des animaux sacrifiés des aspects divinatoires). Elles ont ainsi apporté certaines connaissances purement anatomiques mais sans établir de véritable relation entre organisation et fonction. En effet, il était alors plutôt d'usage de considérer que l'on ne pouvait pas étendre les observations réalisées sur les animaux à l'Homme : la comparaison avec le règne animal paraissait impossible car l'Homme occupait une place privilégiée. Les résultats que l'on tirait de la dissection ou vivisection d'un animal n'étaient valables que pour l'espèce considérée ; extrapoler les résultats semblait trop imprécis (Chapouthier 1998).

Cette idée fut cependant évoquée très précocement par Aristote dans son *Histoire des animaux*. Il recommandait d'utiliser la dissection des animaux pour l'étude de l'anatomie humaine car leurs natures sont proches. Ce concept était alors peu partagé par ses pairs, mais il existe également des ouvrages en son nom dans lesquels il se contredit. Il soutient par exemple, lors de son étude de la répartition des vaisseaux sanguins, qu'il n'est pas nécessaire de disséquer des animaux et d'observer leur circulation sanguine car les résultats ne seraient pas utilisables pour l'Homme. Il suffit selon lui d'amaigrir les animaux pour observer le réseau sanguin à même la peau telles « les nervures d'une feuille morte » (Aristote 343apr. J.-C.).

La Renaissance marque le début d'un changement de mentalité. De plus en plus de médecins commencent à s'intéresser à l'étude des animaux et aux similitudes existantes avec l'Homme. Le *De humani corporis fabrica libri septem* (Vesalius 1543) est considéré comme l'ouvrage fondateur de l'anatomie moderne. L'auteur s'est basé sur l'œuvre de Galien, qu'il a en partie

corrigée, ainsi que sur ses propres observations réalisées à partir de dissections humaines et animales. Le dernier chapitre du septième livre traite de la vivisection animale (Figure 1).

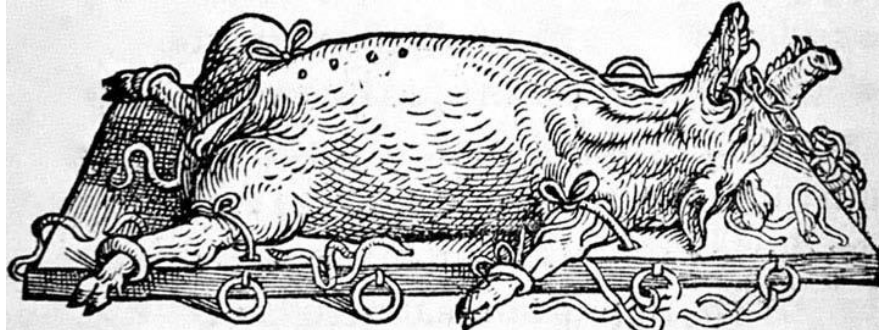


Figure 1 : Porc préparé pour une séance de vivisection. L'ouvrage dont est tirée cette illustration est un traité d'anatomie humaine. Les observations faites lors de séances de vivisection ont permis de comparer les anatomies humaines à celles de certains animaux. Elles ont mis en évidence certaines erreurs faites par Galien et identifié les ressemblances existantes entre différentes espèces animales. Source : <https://hekint.org/2017/01/30/pig-man-pigs-in-medicine-from-galen-to-transgenic-xenotransplantation/>

Pierre Belon (1517-1564) est l'un des premiers à introduire le concept d'anatomie comparée. Dans son ouvrage *Histoire de la nature des oyseaux, avec leurs descriptions et naïfs portraits retirez du naturel* (Belon 1555), il compare un squelette d'oiseau et un squelette humain (Figure 2). Quelques années auparavant, Léonard de Vinci (1452-1519) avait indiqué que « tous les animaux terrestres ont similitude de muscles, de nerfs et d'os et ne varient qu'en longueur ou grosseur ». On est donc bien loin de l'idée répandue durant l'Antiquité ; les expériences réalisées sur les animaux contribuent pleinement à la recherche de la connaissance du fonctionnement des organismes, et notamment du corps humain (Arasse 2019). William Harvey (1578-1657) démontra le fonctionnement de la circulation sanguine générale après de nombreuses vivisections animales et humaines. Son ouvrage *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus* (Harvey 1628) est considéré comme un point de repère dans l'histoire de la physiologie et de la chirurgie (Toledo-Pereyra 2008).

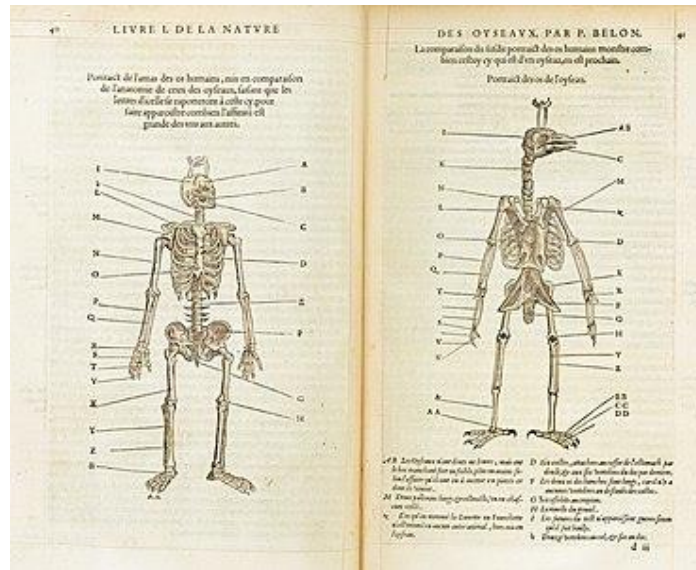


Figure 2 : Extrait de planche d'anatomie comparée. Cette planche illustre la notion d'anatomie comparée : on retrouve un squelette humain à gauche et un squelette d'oiseau à droite. La comparaison entre les deux permet de souligner les similitudes existantes entre les deux espèces. Source : gallica.bnf.fr / BnF

C'est au XIX^e siècle, grâce à François Magendie (1783-1855) et son élève, Claude Bernard (1813-1878), que l'on va assister à un profond remaniement de la pensée scientifique. L'expérimentation animale va devenir pratique courante et systématique de la recherche biologique. On leur doit, à lui et ses élèves Paul Bert, Arsène d'Arsonval ou Albert Dastre, des connaissances essentielles comme le rôle de la sécrétion pancréatique dans la digestion des graisses ou encore la spécificité du curare dans la paralysie de la jonction neuromusculaire. Les animaux se présentent alors comme d'excellents modèles pour l'étude des mécanismes humains ; on ne retrouve plus la pensée contraire des siècles précédents. Claude Bernard évoque cet aspect et ses propos rappellent ceux de Léonard de Vinci : « Tous les animaux peuvent servir aux recherches physiologiques parce que la vie et la maladie se retrouvent partout le résultat des mêmes propriétés et des mêmes lésions, quoique les mécanismes des manifestations vitales varient beaucoup. Toutefois les animaux qui servent le plus au physiologiste, sont ceux qu'il peut se procurer le plus facilement, et à ce titre il faut placer au premier rang les animaux domestiques, tels que le chien, le chat, le cheval, le lapin, le boeuf, le mouton, le porc, les oiseaux de basse-cour » (Bernard 1865). Claude Bernard a également étudié la douleur lors de ses expériences sur les animaux : il en a donc conscience mais cette conscience n'empêche pas au côté nécessaire de l'expérimentation de primer. Sur la table de vivisection, l'animal devient une « véritable machine-vivante » et cette pratique est vue comme un mal nécessaire et préférable à la souffrance humaine. Bernard évoque et étudie ce que l'on considère aujourd'hui comme les prémices de l'anesthésie. Cette discipline est alors plutôt vue comme un moyen pratique de faciliter les manipulations des animaux que pour diminuer leur douleur (Fayolle 2020).

3. Le questionnement éthique entourant ces expériences

La question du bien-être animal et des problèmes éthiques soulevés par leur utilisation a tout autant évolué que les concepts évoqués précédemment. Dès l'Antiquité, les dissections de sujets animaux, voire humains ont soulevé des problèmes moraux. En ce qui concerne les animaux, leur utilisation n'était pas à l'origine de grands questionnements éthiques, mais certains philosophes leur portaient malgré tout un certain respect. Galien était réputé pour utiliser des porcs et des singes. Il déclara ainsi qu'il vaut mieux effectuer les opérations sur des porcs que sur des singes, l'expression faciale de ces derniers étant plus déplaisante. On cherchait plutôt à cette époque à ne pas choquer les observateurs (Chapouthier 1998).

L'utilisation de sujets humains, à l'époque où la comparaison avec l'animal était peu réalisée, était tolérée voire justifiée. Celse, philosophe romain du II^e siècle, rappelle qu'Hérophile et Eristrate, élèves de l'école d'Alexandrie, pratiquaient la vivisection sur des criminels condamnés à mort : « Il n'est pas cruel d'imposer des supplices à quelques coupables, supplices qui doivent profiter à des multitudes d'innocents pendant le cours de tous les siècles » énonçait Celse selon Claude Bernard. Selon Galien, Attale III Philométor, roi de Pergame au II^e siècle, testait des poisons et des contrepoisons sur des condamnés (Bernard 1865).

A partir du XVI^e siècle, la révolution scientifique est à l'origine d'une croissance exponentielle des connaissances biologiques, mais est également reliée à une moindre attention portée au bien-être des animaux utilisés. Comme évoqué précédemment, Claude Bernard se refuse à toute sensibilité envers la souffrance animale et écrit : « Il est essentiellement moral de faire sur un animal des expériences quoique douloureuses et dangereuses pour lui, dès qu'elles peuvent être utiles pour l'Homme. Le physiologiste n'est pas un homme du monde, c'est un savant [...] il n'entend plus les cris des animaux [...] il ne voit que son idée [...] et n'aperçoit que des organismes qui lui cachent des problèmes qu'il veut découvrir » (Bernard 1865). Il ajoute également en parlant de l'utilisation des animaux à des fins scientifiques : « Quant à moi, je pense qu'on a ce droit d'une manière entière et absolue. Il serait bien étrange, en effet, qu'on reconnût que l'Homme a le droit de se servir des animaux pour tous les usages de la vie, pour ses services domestiques, pour son alimentation, et qu'on lui défendît de s'en servir pour s'instruire dans une des sciences les plus utiles à l'humanité. » (Bernard 1865).

Le XIX^e siècle fut donc témoin de la naissance de deux grands courants de pensée au sujet de l'expérimentation animale. L'un prône la connaissance scientifique animale avant tout sans aucun questionnement éthique. L'autre regroupe des penseurs qui prônent le respect des animaux voire considèrent les expériences inutiles. L'ouvrage de Bretschneider résume les éléments s'opposant à l'expérimentation animale et la vivisection. Georges Chapouthier retient de son œuvre que : « des partisans de l'hygiène de vie continuaient à affirmer que les maladies provenaient d'une mauvaise alimentation et non de microbes, ce qui rendait la vivisection inutile ; des penseurs chrétiens s'opposaient à l'interprétation physico-chimique des êtres vivants ; enfin des « moralistes » déploraient le caractère particulièrement cruel de la vivisection, qui, à cette époque, était pratiquée sans anesthésie ». A la fin du siècle, des lois

pour la protection des animaux sont mises en place et l'utilisation de produits anesthésiants se développe ; le combat « antivivisectionniste » perd alors de son intensité (Chapouthier 1998; Bretschneider 1962).

Nous pouvons observer que le statut des animaux au sein de la société a évolué au cours des siècles, favorisant l'encadrement de leur utilisation. Nous proposons maintenant un point sur l'évolution du **statut légal de l'animal**.

4. Le cadre réglementaire : la question du statut légal de l'animal

4.1. L'évolution du statut de l'animal dans les textes de loi

Le Code Civil de 1804 classe les animaux dans la catégorie des biens meubles (article 528, « Sont meubles par leur nature, les corps qui peuvent se transporter d'un lieu à un autre, soit qu'ils se meuvent par eux-mêmes, comme les animaux [...]) et le propriétaire exerce sur eux un droit de propriété. »).

La France fut l'un des premiers pays à mettre en place une loi concernant la protection animale. Avec la Loi Grammont du 2 juillet 1850, les mauvais traitements envers les animaux de compagnie exercés publiquement seront punis.

La question de l'animal et de son utilisation dans l'expérimentation scientifique fut étudiée bien plus tard et donna naissance à la loi du 19 novembre 1963. Elle crée la notion de délit d'actes de cruauté envers les animaux et fixe les sanctions applicables. L'article 454 précise que les personnes ayant « pratiqué des expériences ou recherches scientifiques ou expérimentales sur les animaux sans se conformer aux prescriptions qui seront fixées par un décret en Conseil d'Etat. » seront punies.

C'est ensuite à travers l'article 9 de la loi du 10 juillet 1976 relative à la protection de la nature que l'animal est reconnu en tant qu'être sensible : « tout animal étant un être sensible doit être placé par son propriétaire dans des conditions compatibles avec les impératifs biologiques de son espèce ». Cet article reconnaît non seulement la sensibilité de l'animal mais également ce qu'elle implique dans la façon dont il doit être traité. Néanmoins, il faut noter que cette reconnaissance ne concerne que le Code Rural avec l'article L.214-1. L'animal reste considéré comme un bien, meuble ou immeuble, dans le Code Civil. Ce dernier ne sera modifié qu'en 1999 afin que les animaux ne soient plus assimilés à des choses inanimées ; néanmoins ils restent considérés comme des biens.

En 2012, une proposition de loi concernant la protection animale est faite dans laquelle l'article 515-14 stipule que « Les animaux sont des êtres vivants doués de sensibilité. Ils doivent être placés dans des conditions conformes aux impératifs biologiques de leur espèce et au respect de leur bien-être ». En octobre 2013, la Fondation 30 Millions d'amis lance une pétition dans laquelle elle demande à la Garde des Sceaux de modifier le Code Civil en créant une 3^e catégorie pour les animaux, distincte des « Personnes » et des « Biens » reconnaissant les animaux comme des êtres vivants et sensibles.

Ainsi, depuis le 16 février 2015, le nouvel article 514-14 du Code Civil, relatif à la modernisation et à la simplification du droit et des procédures, reconnaît l'animal en tant « qu'être vivant doué de sensibilité ».

La dernière mise à jour de la réglementation concernant l'expérimentation animale en France (articles R214-87 à R214-137 du Code Rural) a été faite par le décret 2018-118 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et cinq arrêtés datés du 1^{er} février 2013 et publiés le 7 février 2013, en application de la directive 2010/63/UE. Cette réglementation est sous la responsabilité du ministère de l'Agriculture. Ce décret définit les espèces animales concernées, leurs origines et les conditions d'hébergement. Il stipule que toute manipulation doit être réalisée par du personnel compétent, formé et habilité.

La définition actuelle de l'expérimentation animale selon la directive européenne 2010/63/UE indique qu'elle concerne tout ce qui est susceptible « de causer une douleur, une souffrance, une angoisse ou des dommages durables équivalents ou supérieurs à ceux causés par l'introduction d'une aiguille ».

On retrouve également le principe des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement), pilier des règles régissant l'expérimentation animale. Une expérience réalisée sur des animaux ne sera considérée comme licite que si elle respecte 3 points. La procédure en question ne peut être remplacée par une méthode ne nécessitant pas d'animaux (Remplacement). Le nombre d'animaux utilisés doit être réduit au strict minimum (Réduction) et les méthodes choisies doivent être les plus douces envisageables (Raffinement).

4.2. L'avenir de l'expérimentation animale

Le 16 septembre 2021, le Parlement européen a approuvé à la quasi-unanimité une résolution portant sur les plans et mesures visant à accélérer le passage à une innovation sans recours aux animaux dans la recherche, les essais réglementaires et l'enseignement. En d'autres termes, il souhaite la fin de l'expérimentation animale en Europe. Cette volonté n'est pas nouvelle. Déjà en 2010, la directive européenne 2010/63/UE fixait comme objectif ultime le « remplacement total des procédures appliquées à des animaux vivants [...] dès que ce sera possible sur un plan scientifique ».

Les parlementaires ont constaté que depuis cette directive, le nombre d'animaux utilisés pour expérimentation n'a que très peu baissé alors que les possibilités de méthodes alternatives n'ont fait qu'augmenter. Ils citent pour exemple « les nouvelles technologies d'organe sur puce, des simulations informatiques sophistiquées, des cultures 3D de cellules humaines pour l'expérimentation de médicaments, ainsi que d'autres modèles et technologies modernes ». Ils se rallient également à l'opinion citoyenne européenne, majoritairement pour l'interdiction de l'expérimentation. Ils notent l'incidence positive qu'a eu l'interdiction par l'Union européenne de l'expérimentation animale pour les cosmétiques en 2009, démontrant ainsi qu'il serait possible d'étendre cette interdiction à plus de domaines. De nombreux scientifiques semblent s'opposer à ce projet, considérant qu'il est peu réalisable et surtout délétère à la recherche scientifique. Il reste aujourd'hui difficile de

trouver le juste équilibre entre respect du bien-être animal et nécessité des avancées des recherches scientifiques (Muraille 2021).

Nous pouvons donc considérer à ce jour que l'expérimentation animale représente un mal nécessaire. Les législations en vigueur encadrent de manière stricte les chercheurs afin d'éviter au maximum les écarts et respecter au mieux le principe des 3R. A l'heure actuelle, les technologies existantes ne permettent pas de remplacer totalement l'utilisation de modèles animaux. Les chercheurs se penchent de plus en plus sur la question et on voit naître aujourd'hui certains modèles prometteurs. Nous pouvons citer notamment les organoïdes. Il s'agit d'organes miniatures, des ensembles cellulaires en trois dimensions à l'architecture et au fonctionnement proche de l'organe mimé. Ce concept, en plein essor depuis les années 2010, permet aujourd'hui d'étudier les poumons, intestins, rétine et même cerveau. Selon Bertrand Pain, chercheur au sein du Stem Cell and Brain Research Institute à Lyon : « « Les organoïdes obtenus sont encore imparfaits, mais ils ont un potentiel énorme. Ils permettent aussi de réduire le recours aux animaux, et, bien qu'ils ne puissent pas les remplacer pour reproduire le fonctionnement de l'organisme entier, ils permettent de faire des essais préalables et de diminuer le nombre d'expériences *in vivo* » (Mollier 2022). Il va falloir encore patienter afin de voir le devenir de ces recherches prometteuses.

II. L'utilisation du porc dans la recherche

La recherche scientifique compte parmi ses objectifs l'amélioration de la compréhension des mécanismes mis en jeu dans certaines pathologies ainsi que la mise au point de nouveaux traitements. Lors de la conception d'un médicament par exemple, les études se font en plusieurs étapes : conception du produit puis phase de test pré-clinique et enfin phase clinique. Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un médicament candidat, indispensable avant les essais chez l'Homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études est effectué afin de qualifier le médicament candidat sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique et de la toxicologie. Ces essais peuvent être réalisés sur des modèles cellulaires ou sur des modèles animaux.

La souris est aujourd'hui l'animal le plus utilisé en tant que modèle expérimental (Direction générale de la Recherche et de l'innovation 2021). Elle présente des caractéristiques biologiques, techniques et économiques intéressantes. C'est une espèce de petite taille, facile et peu chère à élever et on dispose de méthodes génétiques bien avancées afin d'obtenir des individus possédant les caractéristiques recherchées (Nau 2002).

Malgré tout, et de plus en plus ces dernières années, les chercheurs tentent d'élargir leur horizon et d'étudier d'autres modèles. Il arrive en effet fréquemment que la transposition de thérapies mises au point et validées sur un modèle murin vers des essais cliniques chez l'Homme se traduise par des échecs, en lien avec des physiologies parfois trop peu ressemblantes. Les primates non humains, comprenant les singes et grands singes, correspondraient au modèle idéal du fait de leur proximité évolutive avec l'homme. Néanmoins, leur utilisation en recherche est limitée et contrôlée car elle soulève des problèmes éthiques majeurs. Elle est interdite en France (pour les grands singes humanoïdes : gorille, chimpanzé, orang-outang) depuis 2010 (Gircor 2023).

C'est ainsi que le porc s'est petit à petit fait une place au sein des laboratoires de recherche en tant que modèle prometteur. De plus en plus de groupes de recherches l'utilisent comme modèle, en témoigne le nombre grandissant d'articles concernant les porcs sur PubMed (Figure 3). S'agissant d'un animal consommé, son utilisation est plus acceptée par le public que les autres espèces non-rongeurs.

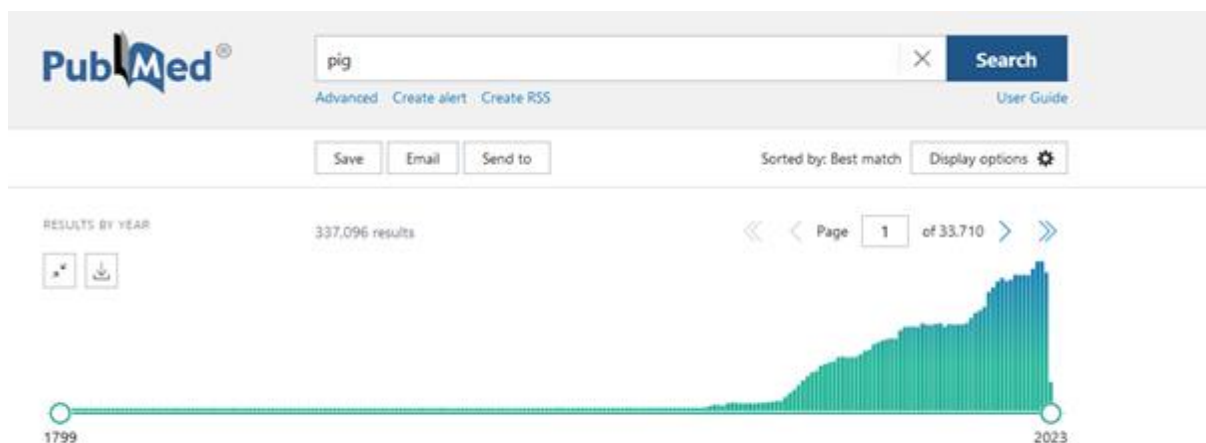


Figure 3 : Nombre de publications associées à la recherche du mot-clé « pig » sur PubMed par année. Ce nombre est en forte croissance depuis les années 1960 et témoigne de l'intérêt grandissant de la communauté scientifique envers le porc. Source : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>

Le choix d'un modèle pré-clinique adapté est complexe. L'anatomie, la taille ou encore la physiologie sont à prendre en compte avant d'utiliser telle ou telle espèce dans des essais pré-cliniques qui se veulent le plus représentatifs d'essais chez l'Homme. Nous allons présenter ici quelques éléments d'anatomie et de physiologie du porc comparés avec l'Homme afin de mettre en évidence les similitudes existantes entre les deux espèces. Nous allons également prendre pour élément de comparaison la souris, afin de comprendre la perspicacité de chaque modèle selon les situations et les études.

Chaque année depuis 2014, le ministère chargé de la recherche réalise une enquête statistique sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques en France (vertébrés et céphalopodes). Le dernier rapport, paru en 2021, indique que le nombre total d'utilisations d'animaux à des fins scientifiques s'élève à 1 893 897 contre 1 643 787 en 2020. La souris reste l'animal le plus utilisé (61% des utilisations) suivi du lapin (9,1%), du rat (8,7%) et du poisson (8% toutes espèces confondues). Concernant plus précisément l'utilisation des porcs, elle représente 0,8% des utilisations totales soit 15 034 animaux (Figure 4). Ils proviennent pour la quasi-totalité d'élevages de l'Union Européenne.

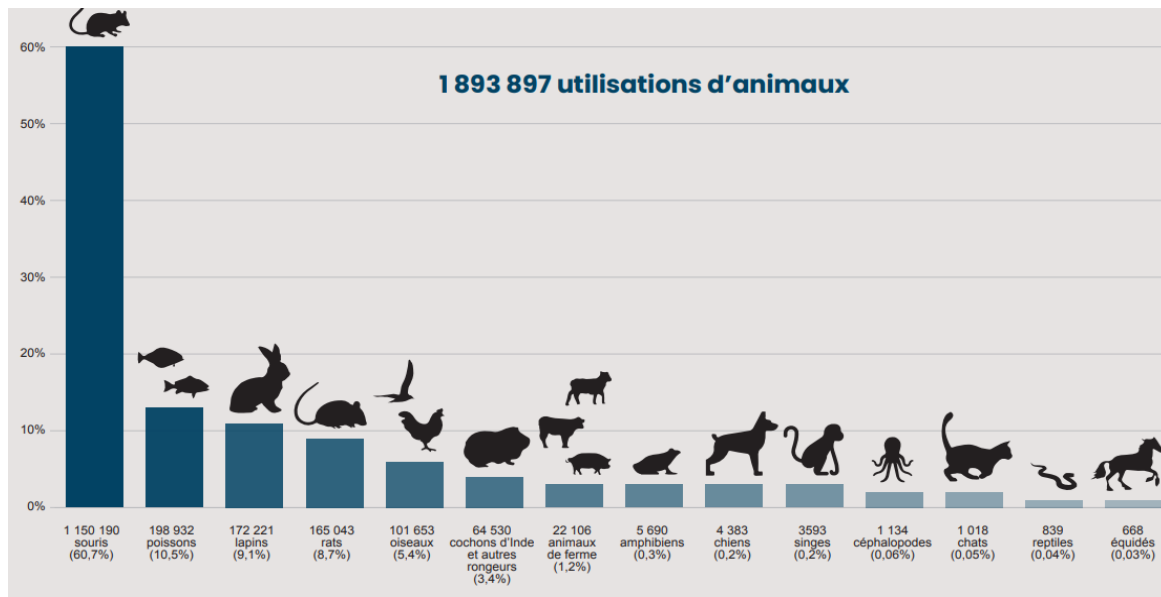


Figure 4 : Principales espèces animales utilisées pour la recherche en 2021 et nombres d'utilisations associés à chaque espèce. Le porc fait partie de la catégorie Animaux de ferme qui représente 1,2% des animaux utilisés. Source : <https://www.gircor.fr/infographie-les-utilisations-danimaux-par-la-recherche-francaise-en-2021/>

1. Caractéristiques biologiques du porc (*Sus scrofa domestica*)

Le porc (*Sus scrofa domestica*), tout comme la souris, est une espèce prolifique avec environ 11,8 petits par portée (entre 10 et 12 pour la souris). Il s'agit d'un animal relativement facile à élever suite aux centaines d'années de domestication de l'espèce mais qui nécessite de plus grands locaux d'hébergement que la souris (Fairbairn et al. 2011). Sa durée de vie (environ 20 ans) permet la réalisation de protocoles sur la durée, plus longs que chez la souris (espérance de vie de 1,5 à 3 ans). Les porcs arrivent à maturité sexuelle relativement tôt pour une espèce de cette taille (6-7 mois). La période de gestation est assez courte (4 mois) et la reproduction n'est pas saisonnée.

Sa taille rend possible les prélèvements sanguins multiples et les examens invasifs tels qu'une endoscopie, mais en fait en revanche un animal plus difficile à manipuler qu'un rongeur. Il est possible d'utiliser le matériel de médecine humaine pour les porcs de grande taille (Lunney 2007).

De nombreuses races existent avec des tailles et des poids très variables ce qui offre un panel important de sujets possibles (Hryhorowicz et al. 2017). Parmi les races les plus utilisées, nous pouvons citer pour les mini-porcs le Göttingen ou le Yucatan ; le LargeWhite ou le Landrace pour les races de plus grande taille (Figure 5).

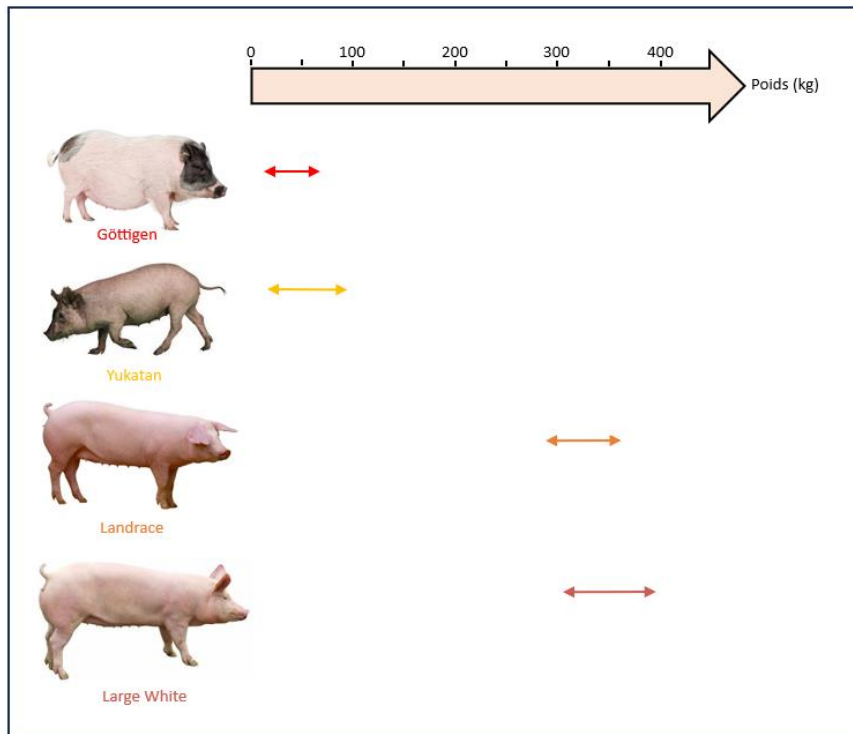


Figure 5 : Quelques races porcines parmi les plus utilisées dans la recherche et poids moyen des individus. Par ordre croissant de poids moyen des individus, on retrouve le Göttigen pesant de 26 à 55kg, le Yuktan pesant de 35 à 70kg, le Landrace de 300 à 350kg et le Large White de 320 à 380kg. Source : Besson Eloïse

Le porc est un animal sociable qu'il est préférable d'élever avec des congénères. Cependant, pour certaines études au cours desquelles des prélèvements sanguins réguliers sont nécessaires, les porcs peuvent avoir des cathéters ce qui implique de les maintenir isolés, source potentielle de stress. De plus, il faut être prudent lors des manipulations afin de minimiser le stress engendré. En effet, en cas de stress intense, une leucocytose de stress est rapidement observable à la numération formule sanguine qui peut fausser les résultats (Pabst 2020).

Le porc a un régime omnivore, tout comme l'Homme et la souris. Des études de 2016 ont démontré l'existence d'une importante similitude (près de 96%) entre les microbiotes porcins et humains (Xiao et al. 2016).

1. Similarités entre le porc et l'homme

1.1. Génome

Le génome correspond à l'ensemble des gènes portés par les chromosomes chez une espèce donnée. Son séquençage complet permet l'étude spécifique de différents gènes et leur comparaison entre différents individus ou espèces.

Le génome humain est connu et entièrement séquencé depuis 2003. Ce séquençage est l'aboutissement du *Human Genome Project* lancé aux Etats-Unis en 1988 et placé sous la tutelle du *National Institut of Health* (Gachelin 2022). Le génome murin est quant à lui connu depuis décembre 2002. Nous pouvons d'ailleurs noter que 40% du génome humain est superposable à celui de la souris et qu'environ 80% des 30 000 gènes de la souris sont présents dans le génome humain (Nau 2002). Ce dernier comprend 23 paires de chromosomes contre 20 paires chez la souris.

Il faudra attendre l'année 2012 pour obtenir le séquençage complet du génome porcin, initié en 2003. Le génome porcin est actuellement le mieux connu après celui des primates et des rongeurs. Celui-ci comprend 19 paires de chromosomes et sa taille est estimée à 2,7 Gigabases (Gb). La taille du génome porcin est inférieure d'environ 7 % par rapport à celle du génome humain (=3 Gb), contre 14% pour le chien et la souris. Il a été démontré que du point de vue de la séquence nucléotidique, les porcs présentent trois fois plus de similarités avec l'homme que la souris (Walters et al. 2012).

Ce projet de séquençage représente un enjeu tant pour l'agro-alimentaire que pour la recherche scientifique. Il a permis d'obtenir de nouveaux éléments utiles pour la production de viande de haute qualité, de porcs plus résistants aux maladies et d'une durée de vie plus longue. Il a également permis d'identifier « de nombreux variants de gènes responsables de maladies humaines dont les protéines associées étaient identiques chez le porc, confirmant l'intérêt d'utiliser ce dernier comme modèle en biomédecine. Parmi les affections concernées : l'obésité, le diabète, les maladies de Parkinson et d'Alzheimer » (Vergonjeanne 2012).

L'immunome correspond à l'ensemble des gènes associés à l'immunité innée et acquise. En 2013, l'IRAG (*Immune Response Annotation Group*) a mené une étude sur le séquençage de l'immunome porcin afin de le comparer à celui de l'Homme. Cette étude a permis d'identifier plus de 1000 gènes associés à la réponse immunitaire. Les chercheurs ont ainsi montré une divergence supérieure existant entre l'immunome humain et murin qu'entre l'immunome humain et porcin. Précisément pour les gènes de l'immunité, la grande majorité des gènes humains perdus lors de l'évolution chez la souris se retrouve chez le porc (Dawson et al. 2013).

La plupart des protéines du système immunitaire porcin partage des similarités structurales et fonctionnelles avec celles du système immunitaire humain. Certaines portions analysées présentent plus de 80% de ressemblances avec l'humain contre moins de 10% avec la souris (Pabst 2020).

1.2. Organes lymphoïdes

Les organes lymphoïdes, primaires ou secondaires, appartiennent au système lymphatique. On distingue les organes primaires, lieu de maturation des lymphocytes (thymus pour les lymphocytes T et moelle osseuse pour les lymphocytes B chez les mammifères) et les organes secondaires représentés par les ganglions lymphatiques, la pulpe blanche de la rate et les

tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Pour résumer leurs différentes fonctions, les ganglions lymphatiques assurent le drainage de la lymphe, la rate est en lien avec la circulation sanguine et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses assurent la captation des antigènes pénétrant au travers des épithéliums de recouvrement (Male et al. 2007 ; Owen, Punt, Stranford 2013).

Les ganglions fonctionnent comme des filtres de la circulation lymphatique. Des vaisseaux lymphatiques afférents y pénètrent par la périphérie. La lymphe circule lentement au travers de la trame constitutive de l'organe et rejoint ensuite un vaisseau lymphatique efférent qui aboutit au canal thoracique, qui s'ouvre dans la veine sous-clavière gauche et rejoint ainsi la circulation sanguine (Male et al. 2007).

La lymphe afférente contient des lymphocytes, quelques neutrophiles et des cellules dendritiques. La lymphe efférente contient très peu de lymphocytes chez le porc en comparaison avec d'autres espèces (Pabst 2020).

La dynamique générale de la circulation lymphatique est semblable pour le porc, la souris et l'Homme. Cependant, l'histologie est différente : on parlera chez le porc de « nœud lymphatique inversé ». Chez l'Homme et la souris, le ganglion est limité extérieurement par une charpente conjonctive, une fine capsule constituée de fibres de collagènes et de fibrocytes. Cette capsule est perforée par des vaisseaux lymphatiques afférents. A l'intérieur du ganglion, les lymphocytes sont répartis en trois zones qui communiquent entre elles. Le cortex est la zone périphérique de l'organe et contient principalement des lymphocytes B organisés en follicules lymphoïdes. La région para-corticale, située sous le cortex, est principalement peuplée de lymphocytes T. Elle est également riche en cellules interdigitées qui expriment une grande quantité de Complexe Majeur d'Histocompatibilité II (CMH II) en surface. Ces cellules interdigitées proviennent de la peau (cellules de Langerhans) ou des muqueuses (cellules dendritiques) et jouent un rôle dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Les veinules à endothélium épais (HEV pour *High Endothelium Venules*) sont des vaisseaux post-capillaires présents dans le para-cortex, qui permettent aux lymphocytes de la circulation sanguine d'entrer dans le ganglion. Enfin, la médullaire est la zone centrale du ganglion, constituée de sinus entourés de cordons cellulaires. Elle contient des lymphocytes T et B, ainsi que de nombreux plasmocytes (cellules produisant des anticorps) et des macrophages. La médullaire joue un rôle dans la filtration de la lymphe et l'élimination des agents pathogènes. Chaque ganglion possède sa propre vascularisation artérielle et veineuse (Male et al. 2007 ; Owen, Punt, Stranford 2013).

Chez le porc, la structure ganglionnaire est inversée (Figure 6). Ainsi, les follicules lymphoïdes se distribuent au centre du ganglion. La médulla occupe une position périphérique. Elle ne comporte ni cordon médullaire, ni sinus. Sa structure fibreuse épaisse empêche tout trafic important de lymphocytes, ce qui explique leur faible proportion dans les conduits lymphatiques efférents. Les macrophages sont nombreux au niveau de la jonction cortico-médullaire. La zone corticale est riche en HEV (Pastoret, Govaerts, Bazin 1990).

De plus, chez le porc, les HEV sont non seulement des entrées mais aussi des lieux de sortie des lymphocytes. On retrouve très peu de lymphocytes dans les vaisseaux lymphatiques efférents car leur recirculation est essentiellement sanguine (les lymphocytes quittent le sang et y reviennent via les HEV des ganglions) (Pabst 2020).

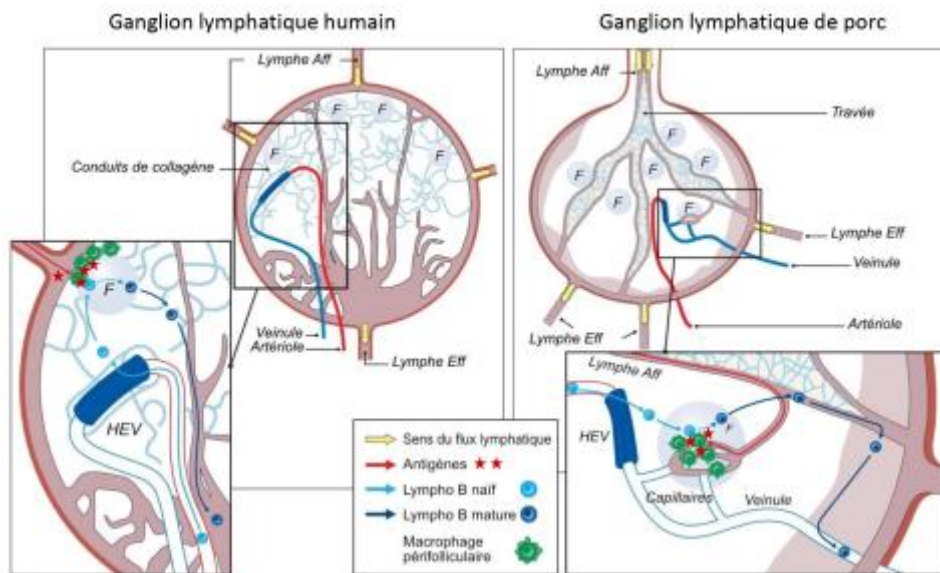


Figure 6 : Organisation schématique des noeuds lymphatiques humain et porc. Le nœud lymphatique porcine présente une structure dite inversée. Source : <https://www6.angers-nantes.inrae.fr/bioepar/Actualites/Comment-fonctionne-le-ganglion-lymphatique-inverse-chez-le-porc>

La rate du porc est similaire à la rate humaine (Pabst 2020).

Le porc possède des tonsilles, autrement appelées amygdales, organes lymphatiques situés au niveau du pharynx à l'entrée des voies respiratoires. L'ensemble des amygdales forme un anneau appelé anneau de Waldeyer. A l'exception des primates, l'anneau observé chez le porc est le plus proche de celui retrouvé chez l'Homme. A noter que les souris ne possèdent pas de tonsilles. (Meurens et al. 2012)

Selon Pabst (2020), le porc est un bon modèle pour étudier la circulation des cellules lymphoïdes au sein du thymus.

1.3. Le coeur

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde, la deuxième en France après les cancers (Ministère de la Santé et de la prévention 2023a). La recherche scientifique dans le domaine cardiovasculaire constitue donc un véritable enjeu sociétal. Pour ce faire, la souris a longtemps été utilisée comme modèle et a permis de

rassembler de nombreuses informations au niveau moléculaire et cellulaire de la biologie cardiaque. Néanmoins, il est souvent difficile d'extrapoler des résultats à l'humain en raison des nombreuses différences existant entre les 2 espèces : fréquence cardiaque, consommation d'oxygène ou encore durée des potentiels d'action et nature des courants ioniques permettant ces potentiels. C'est ainsi que les chercheurs se sont préférentiellement tournés vers l'espèce canine pour la recherche cardiovasculaire. Néanmoins, ont été mises en évidence des caractéristiques spécifiques rendant ce modèle parfois peu fiable et l'extrapolation des résultats à l'Homme difficile. Le chien présente un réseau artériel coronaire à dominance gauche, contrairement à l'Homme ou au porc qui présentent un réseau à dominance droite. Le chien présente également une densité capillaire élevée et surtout une collatéralité coronarienne native permettant une tolérance accrue à l'ischémie myocardique (Grandmougin et al. 2016a).

Le porc s'est donc imposé ces dernières années comme modèle recevable pour la recherche cardiovasculaire. Son utilisation est également plus acceptée que celle du chien par la population (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014). De nombreuses études anatomiques et physiologiques ont permis de confirmer l'existence de très grandes similitudes entre le cœur porcine et le cœur humain.

Tout d'abord, nous pouvons nous intéresser au rapport poids du cœur sur poids du corps. Chez l'Homme, ce rapport se situe entre 0,45 % et 0,5 %. Certaines espèces de porc présentent un rapport très proche de celui de l'homme, ce qui permet d'en faire de bons modèles dans des protocoles expérimentaux s'intéressant à la physiologie cardiaque et ses troubles, ou encore d'envisager d'éventuelles xénogreffes (Tableau I) (Grandmougin et al., 2016).

Espèce	Homme	Porc > 45 kg	Porc < 45 kg	Bovins	Chat	Chien	Mouton	Cheval
Poids ♥ / Poids corps (%)	0.5	0.25-0.30	0.5	0.4-0.5	0.47	0.7-1.0	0.5-0.6	0.7-1.1

Tableau I : Variation du rapport R (%) du poids du cœur/poids du corps selon les espèces animales. Le rapport R est proche entre l'Homme et certaines races de porcs. Source : (Grandmougin et al. 2016)

D'après le tableau I, considérant ce rapport, les mini-porcs comme le Yucatan ou le Göttingen sont les plus intéressants. Pour un poids donné, un mini-porc sera plus mature qu'un porc de grande race et ses tissus seront plus résilients aux expérimentations. De plus, il a été montré que les races de ferme comme le Yorkshire ou le Landrace sont sujets aux fibrillations ventriculaires (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014).

i. Similitudes entre les cœurs porcine et humaine

La plupart des différences anatomiques entre les cœurs porcine et humaine sont à relier à la différence de posture, respectivement quadrupède et bipède. Les conformations thoraciques diffèrent également : le thorax humain présente une compression dorso-ventrale alors que celle-ci est latérale chez d'autres mammifères comme le porc.

D'un point de vue morphologique, le cœur porcine présente une forme de cœur Valentin ou de pyramide inversée. Le cœur humain est quant à lui plutôt trapézoïde (Figure 7).

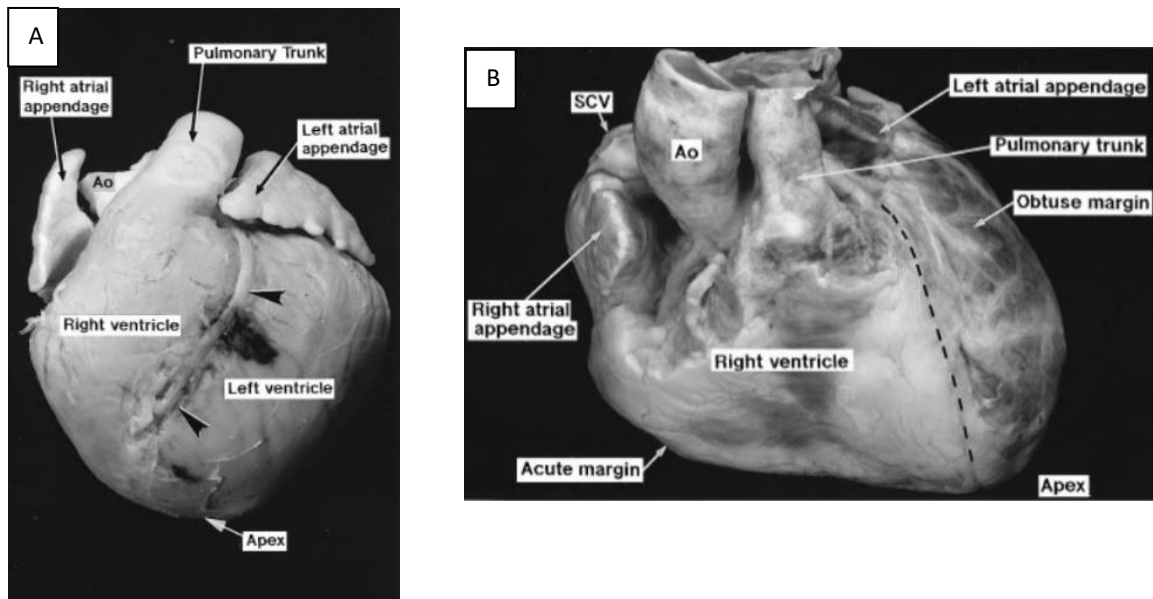


Figure 7 : Comparaison morphologique des cœurs porcine et humaine. Le cœur porcine (A) possède une forme de cœur Valentin tandis que le cœur humain (B) est plutôt trapézoïde. Ao, Aorte ; SCV, Superior Caval Vein ou Veine Cave Supérieure. Right atrial appendage, auricule droite ; Pulmonary Trunk, tronc pulmonaire ; Left atrial appendage, auricule gauche ; Right ventricle, ventricule droit ; Left ventricle, ventricule gauche ; Obtuse margin, bord gauche du cœur ; Acute Margin, bord droit du cœur. D'après (CRICK et al. 1998)

Le positionnement et l'orientation axiale du cœur se distinguent entre les 2 espèces. L'axe long du cœur est pratiquement perpendiculaire à l'axe longitudinal du corps chez le porc, alors que chez l'homme, ces deux axes forment un angle d'environ 50 degrés (Figure 8) (CRICK et al. 1998).

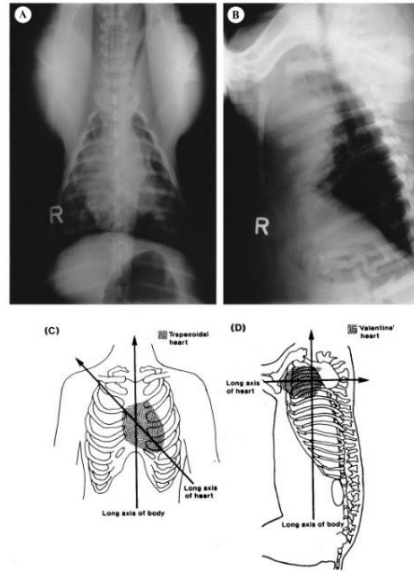


Figure 8 : Radiographies thoraciques et orientation cardiaque chez l'Homme (A) et le porc (B). Les flèches représentent les axes longs du cœur et du corps. D'après (CRICK et al. 1998)

Tout comme chez l'Homme, le cœur porcine présente 4 valves (tricuspide, pulmonaire, mitrale et aortique) qui intéressent respectivement le cœur droit et le cœur gauche. La valve mitrale porcine présente des caractéristiques similaires à la valve humaine tant pour la taille que les cordages tendineux. Pour ce qui est de la valve aortique, on retrouve une légère différence au niveau de la taille et de la géométrie de ces cordages. La valve tricuspide possède 3 feuillets chez l'Homme et le porc, contre 2 chez le chien. Des différences ont été mises en évidence à l'échelle microstructurale des valves, quant à l'expression de la métalloprotéinase 1 (endopeptidase impliquée dans de nombreux processus de remodelage de la matrice extracellulaire) ou de la distribution des protéoglycanes (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014).

Les atriums gauche et droit sont de taille plutôt similaire chez le porc alors que le droit est de taille supérieure au gauche chez l'Homme (CRICK et al. 1998). L'oreillette droite est de forme tubulaire chez le porc et triangulaire chez l'Homme. Le rapport entre les parois des ventricule gauche et droit est plus important chez le porc que chez l'Homme (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014).

Les veines caves supérieure et inférieure chez l'Homme, qui assurent l'apport du sang désoxygéné au cœur, sont appelées veines caves crâniale et caudale chez le porc. Celles-ci arrivent dans l'atrium droit en formant un angle droit chez le porc, alors qu'elles sont parallèles chez l'Homme (Figure 9) (CRICK et al. 1998).

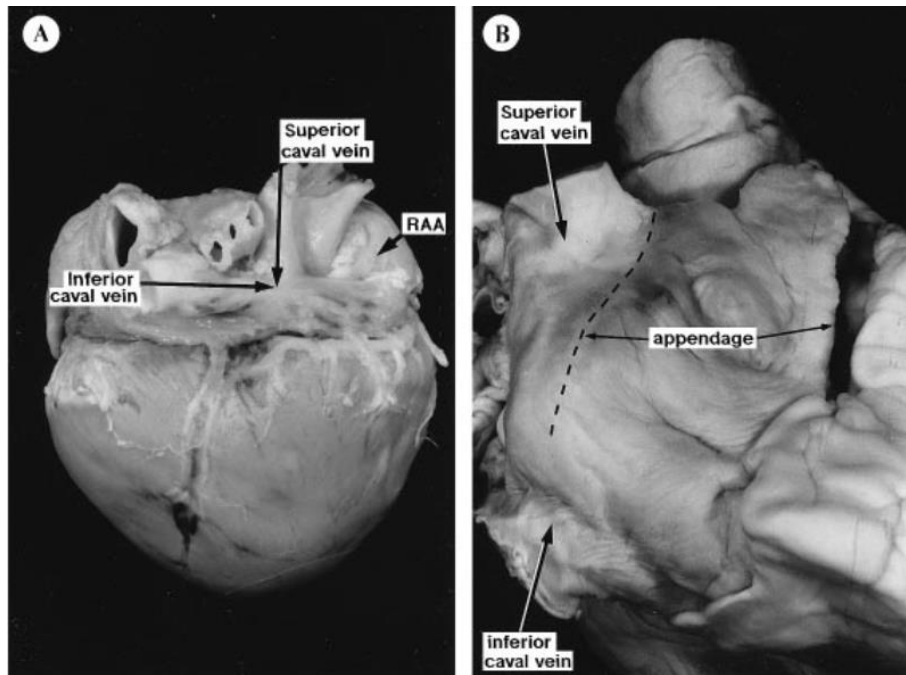


Figure 9 : Comparaison de l'organisation des veines caves chez le porc (A) et l'Homme (B). Ces veines arrivent dans l'atrium droit en formant un angle droit chez le porc alors qu'elles sont parallèles chez l'Homme. RAA, Right Atrial Appendage (auricule droit). Source : (CRICK et al. 1998).

Pour ce qui est de l'atrium gauche, il reçoit 2 veines pulmonaires chez le porc, alors que l'on retrouve 4 à 5 orifices chez l'Homme, et 5 à 6 chez le chien (Grandmougin et al., 2016).

Les artères coronaires, qui prennent naissance à la base de l'aorte, assurent la vascularisation du myocarde. On distingue le réseau coronaire gauche et droit. On parle de dominance droite ou gauche selon l'origine de l'artère descendant dans le sillon longitudinal postérieur. Pour une dominance gauche, l'artère que l'on retrouve au niveau du sillon longitudinal postérieur provient de l'artère circonflexe ; c'est le cas des chiens et des ruminants. Dans le cas d'une dominance droite, l'artère en question provient de l'artère coronaire droite : c'est cette organisation qui est partagée par l'Homme et le porc (Figure 10). C'est néanmoins l'artère coronaire gauche qui irrigue la majeure partie du myocarde chez ces espèces (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014).

Le réseau coronaire artériel est très semblable entre les 2 espèces. Le cœur de porc présente plusieurs faces sur lesquelles les artères coronaires cheminent selon une répartition identique à celle que l'on retrouve sur un cœur humain (CRICK et al. 1998).

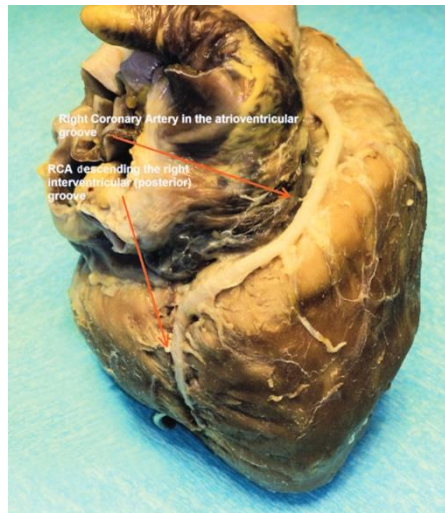


Figure 10 : Réseau coronarien porcine et mise en évidence de la dominance coronarienne droite. RCA , Right Coronary Artery (Artère coronaire droite). Source : (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014)

Comme évoqué précédemment, le chien est souvent utilisé comme modèle dans la recherche cardio-vasculaire. Or, il a été montré qu'il existe une grande variabilité de distribution du réseau de circulation coronaire entre les individus de cette espèce, diminuant ainsi la répétabilité des expériences. De plus, il existe une importante collatéralité coronarienne native qui peut compenser jusqu'à 40% de la circulation coronaire en cas d'occlusion et permettre une tolérance accrue à l'ischémie myocardique (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014).

Ainsi, en cas d'occlusion d'une branche de l'artère descendante antérieure gauche, les espèces chez lesquelles on observe le moins ces flux collatéraux jusqu'à la zone ischémisée sont, dans l'ordre croissant le porc, le lapin, le babouin, le furet, le rat, le chien, le chat et enfin le cobaye. Ces anastomoses inter coronariennes de surface sont beaucoup moins observées chez le porc que chez le chien, et la variation de la distribution coronaire entre individus est semblable entre le porc et l'homme. Le modèle canin peut donc être utilisé dans des cas de lésions se développant lentement, permettant ainsi la mise en place de circulation collatérale chez le chien comme chez l'Homme (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014; Nielsen et al. 2009).

Le réseau veineux est quant à lui bien différent, notamment au niveau de la veine azygos gauche. Celle-ci entre dans le sinus coronaire chez le porc, alors que chez d'autres espèces comme l'Homme, elle rentre au niveau de la veine cave (Figure 11). Ce sinus coronaire reçoit 4 afférences chez le porc contre 3 chez l'Homme.

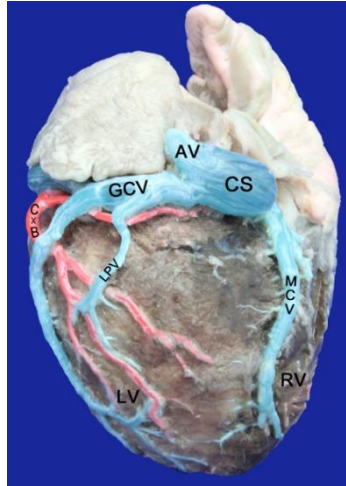


Figure 11 : Etude morphologique de la surface droite du cœur porcin et mise en évidence de la veine azygos (AV) spécifique du porc. RV=Right ventricle; LV=Left ventricle; RA=Right atrium; CS=Cylindrical coronary sinus, MCV=Middle cardiac vein; CxB=Circumflex branch; GCV=Great cardiac vein; AV=Azygos vein; LPV=Left posterior vein. Source : (Alejandro Gómez, Ballesteros, Stella Cortés 2015)

Il a été montré qu'il existe des différences de conductivité et contractilité entre le porc et l'Homme, en lien avec des différences anatomiques au niveau du réseau de Purkinje. La trabécule septomarginale ou bandelette modératrice est située dans le ventricule droit et porte des fibres du réseau de Purkinje. Celles-ci participent à la contraction ventriculaire. Chez le porc, cette bandelette est plus proéminente et plus proximale à la base du cœur que chez l'homme (Figure 12) (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014).

Enfin, il existe au niveau du cœur porcin de nombreux nerfs supplémentaires par rapport à ceux observés chez l'Homme. Son système de conduction cardiaque est ainsi qualifié de neuromyogénique, en opposition au système myogénique humain (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014).

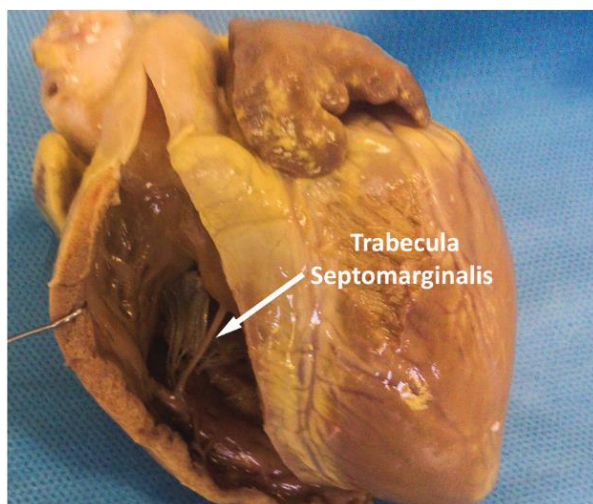


Figure 12 : Dissection du ventricule droit d'un cœur de porc. La flèche blanche indique la bande modératrice qui est plus proéminente et plus proximale à la base du cœur chez le porc que chez l'Homme. Source : (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014)

ii. Intérêts et perspectives de l'utilisation du porc comme modèle en cardiologie

Les nombreuses similitudes existantes entre les cœurs porcins et humains intéressent particulièrement les chercheurs ces dernières années et font du porc un modèle pré-clinique prometteur, voire le plus approprié selon certains, pour la recherche cardiovasculaire ou même le développement de xéno greffes (transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur). La large variété de races permet d'obtenir des greffons de tailles différentes afin de s'adapter au mieux au futur receveur.

Les maladies cardiovasculaires constituent l'une des causes principales de mortalité dans le monde. Parmi celles-ci, on compte notamment l'athérosclérose, maladie inflammatoire chronique caractérisée par le dépôt de plaques d'athéromes (composés lipidiques). À terme, ces plaques peuvent conduire à l'obstruction du vaisseau, entraîner la lésion de la paroi artérielle (on parle de sclérose) ou encore se rompre, avec des conséquences souvent dramatiques. On retrouve certains facteurs de risques comme le tabagisme, l'alcoolisme ou le surpoids, ainsi que des facteurs génétiques. Il a été montré que des mutations dans les gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines peuvent favoriser l'hypercholestérolémie ou l'athérosclérose. Le porc constitue un modèle intéressant car contrairement à la souris, il peut développer spontanément de l'athérosclérose (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014). Des modèles de porcs génétiquement modifiés ont été créés et ont aidé à développer et améliorer des outils de diagnostics ou des équipements (Tedgui 2017).

Concernant les xéno greffes, l'avancée la plus récente que nous pouvons citer correspond à la greffe d'un cœur porcine chez un patient de 57 ans atteint d'une cardiomyopathie en phase terminale par une équipe de médecins de l'université du Maryland, en janvier 2022. Le greffon

a été prélevé sur un porc qualifié « d’humanisé » car modifié génétiquement dans le but de diminuer le risque de rejet par l’organisme. Au total, dix modifications génétiques uniques ont été effectuées sur le porc donneur. Le patient est malheureusement décédé au 57^e jour post transplantation, la ou les causes possibles étant encore étudiées (Laratte 2022).

1.4. Le foie

i. Anatomie et histologie comparées

Les foies du porc et de l’Homme sont macroscopiquement différents. Le foie porcine est lobulaire, épais en son centre et s’affine vers les extrémités. Chez l’Homme, on retrouve une forme plutôt triangulaire et la taille diminue de la droite vers la gauche. Le nombre de lobes est identique : il y a quatre lobes divisés en huit segments (Figure 13).

Chez le porc, on retrouve le lobe latéral gauche divisé en segments II et III ; le lobe médial gauche constitué par le segment IV ; le lobe latéral droit formé par les segments I, VI et VII et le lobe médial gauche divisé en segments VIII et V (Ntonas et al. 2020). La terminologie est différente chez l’Homme chez lequel on retrouve les lobes droit, gauche, carré et caudé (ou lobe de Spiegel) (Kruepunga et al. 2019).

La vascularisation du foie est assurée par les 2 principaux vaisseaux hépatiques : l’artère hépatique et la veine porte. Le système vasculaire artériel hépatique est identique chez le porc et l’Homme. Pour ce qui est du réseau veineux, il existe des différences mineures. Ainsi, chez l’Homme, la veine porte se divise en amont du parenchyme hépatique en deux branches portales gauche et droite. Chez le porc, cette division a lieu au niveau du hile hépatique (Ntonas et al. 2020).

Le système biliaire permet la sécrétion de la bile contenant les métabolites synthétisés par le foie et son excrétion vers le duodénum via les canaux biliaires. Chez le porc et l’Homme, les deux systèmes biliaires sont très proches, tant sur le plan anatomique que fonctionnel, à l’exception du drainage du segment I. Il est réalisé via le canal hépatique gauche chez l’homme, tandis que le canal hépatique droit assure cette tâche chez le porc (Ntonas et al. 2020).

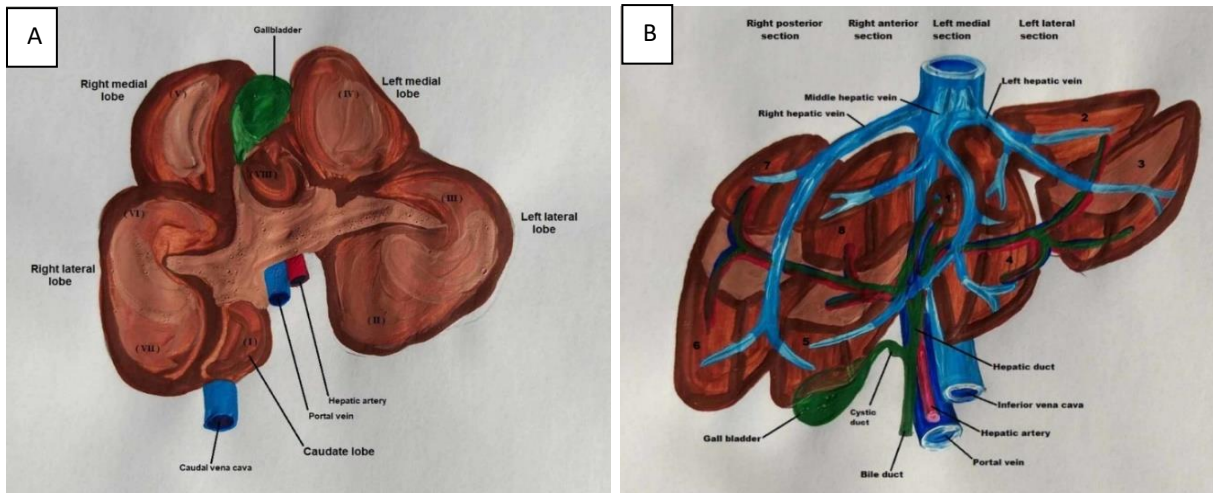


Figure 13 : Anatomie comparée entre le foie du porc (A) et de l'Homme (B). D'après (Ntonas et al. 2020)

Quelques différences existent au niveau histologique. Chez le porc, les lobules (unités fonctionnelles du foie) sont nettement individualisés. Chaque lobule de forme polyédrique est entouré par une fine cloison conjonctive. Chez l'Homme, ces lobules ne sont pas cloisonnés. Ils sont délimités virtuellement par des espaces conjonctivo-vasculaires appelés les espaces portes (Thibaud et al. 2018). Chaque lobule est constitué d'hépatocytes agencés en travées et disposés autour de la veine centro-lobulaire (Figure 14).

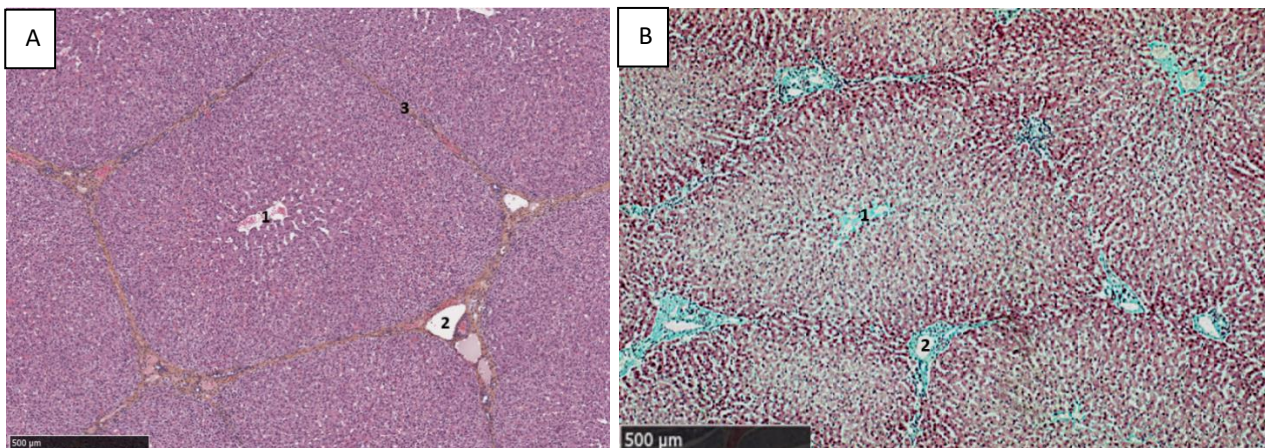


Figure 14 : Parenchyme hépatique de (A) porc ; (B) humain coloré au HES. 1 Veine centrolobulaire ; 2 Espace porte ; 3 Tissu conjonctif interlobulaire. Les lobules hépatiques porcins sont cloisonnés, contrairement à ceux de l'Homme. Barre d'échelle : 500µm. A : NDP.view, Objectif*5, Source : Eloïse BESSON. B : d'après (Thibaud et al. 2018)

Il existe au sein du foie des macrophages résidents spécifiques appelés les cellules de Kupffer. Elles sont situées en bordure des sinusoides (réseau capillaire) hépatiques et représentent environ 30 % des cellules non parenchymateuses du foie (Figure 15). Ces cellules possèdent de nombreux pseudopodes qui sont en contact direct avec le sang des vaisseaux. Ceux-ci s'insèrent entre les cellules endothéliales. Les cellules de Kupffer ont de multiples rôles. Leur fonction principale est la phagocytose assurant la défense du foie contre les bactéries, endotoxines et infections virales. Elles jouent aussi un rôle dans la dégradation du fer et de la bilirubine, dans le métabolisme du cholestérol ou encore synthétisent des lymphokines régulant l'activité des hépatocytes (Wardle 1987).

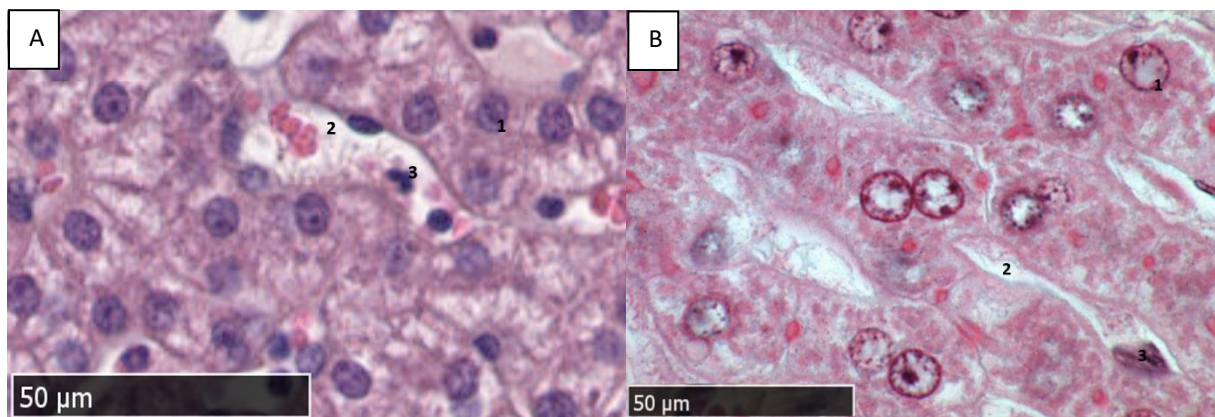


Figure 15 : Parenchyme hépatique de (A) porc ; (B) d'humain coloré au HES. 1 Hépatocyte ; 2 Sinusoïde hépatique ; 3 Cellules de Kupffer. Barre d'échelle : 50µm. A : NDP.view, Objectif*40, Source : Eloïse Besson. B : d'après (Thibaud et al. 2018)

ii. Intérêts et perspectives de l'utilisation du porc comme modèle en hépatologie

Les similitudes anatomiques existant entre le foie de l'Homme et du porc font de ce dernier l'espèce préférée pour de futures xénotransplantations. Le nombre grandissant de patients en attente d'une greffe et le manque de greffons humains motivent les chercheurs à trouver de nouvelles alternatives. En 2017, le ratio entre patient en attente de greffe de foie et receveur était de 2,4 (Joubert, Péron, Bureau 2020).

Il existe cependant de nombreux risques associés à une xéno greffe de foie. Le premier correspond au phénomène d'*Hyperacute Rejection* qui peut avoir lieu dans les minutes ou heures suivant la greffe. Il résulte de la liaison d'anticorps du receveur à des antigènes naturellement présents à la surface de l'endothélium vasculaire porcin ce qui active la cascade du complément. Il a été montré que le principal antigène mis en cause possède une terminaison carbohydrate qui est ajoutée grâce à l'enzyme $\alpha 1,3$ galactosyltransferase. Il est aujourd'hui possible de générer des porcs dits $\alpha 1,3$ galactosyltransferase *gene-knockout* qui ne possèdent donc plus cette enzyme, ce qui a permis de réduire considérablement le risque de rejet aigu (Ekser et al. 2012).

Dans les jours ou semaines suivants la greffe, il est possible d'observer un autre phénomène appelé *Acute Humoral Xenograft Rejection*. Il est fréquemment observé durant cette même période l'apparition d'une thrombocytopenie rapide et des troubles sévères de la coagulation, conduisant à des hémorragies fatales pour le receveur. Les mécanismes précis de ces phénomènes ne sont pas connus actuellement. L'ensemble de ces éléments fait qu'aujourd'hui, la durée maximale de survie obtenue lors d'une xéno greffe de foie est d'un mois. De nombreux essais ont été réalisés depuis les années 2000 chez des primates non humains : en 2017, Shah et al. a réalisé une greffe porc vers babouin avec une durée de survie de 29 jours (Cross-Najafi et al. 2022) (Ekser et al. 2012). Des études ont cependant montré que si l'on dépassait ces phases de rejets, les xéno greffons pourraient assurer de manière tout à fait satisfaisante les différentes fonctions hépatiques (Cross-Najafi et al. 2022).

Un seul essai clinique rapporte une tentative de greffe de foie de porc chez un humain, celui réalisé par Makowa et al. en 1995 chez une patiente de 26 ans souffrant d'une décompensation hépatique sur antécédents d'hépatite auto-immune accompagnée d'une encéphalopathie de grade III. Trente-quatre heures après la transplantation, le greffon montrait des signes importants d'ischémie, de thrombose et la patiente est décédée suite au développement de lésions cérébrales irréversibles (Makowa et al. 1995).

L'utilisation du foie porcine pourrait donc représenter une véritable avancée pour le traitement des patients en stade terminal de maladies hépatiques dans les années à venir. Des études afin de comprendre précisément les mécanismes mis en jeu lors du rejet sont à poursuivre.

1.5. Les poumons

i. Anatomie et histologie comparées

Le porc tout comme l'Homme possède 2 poumons divisés en lobes. L'organisation du poumon gauche est semblable chez les 2 espèces avec une division en 2 lobes : on parle des lobes supérieur et inférieur chez l'Homme ; crânial et caudal chez le porc. Au niveau du poumon droit, on retrouve 3 lobes chez l'Homme (supérieur, moyen, inférieur) contre 4 chez le porc (crânial, médial, accessoire, caudal). Le lobe crânial droit est directement relié à la trachée par la bronche lobaire du lobe crânial droit chez le porc (Figure 16) (Meurens et al. 2012).

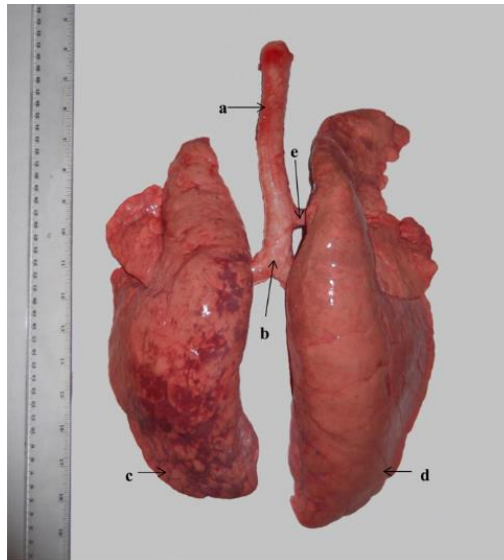


Figure 16 : Anatomie pulmonaire porcine. Photographie de poumons de porc (vue dorsale, âge environ 22 semaines, environ 105kg) montrant (a) la trachée, (b) la carène, (c) le poumon droit, (d) le poumon gauche et (e) la bronche lobaire du lobe crânial droit. Echelle : règle de 30 cm. D'après (Judge et al. 2014).

Les structure, morphologie et distribution des voies respiratoires varient selon l'âge et la race étudiée mais sont globalement semblables à celles retrouvées chez l'Homme. La trachée porcine est plus cartilagineuse et plus longue que la trachée humaine. Les structures des voies respiratoires sont plus cartilagineuses chez le porc mais dans les deux espèces, on observe une diminution du diamètre des voies et de leurs longueurs au fur et à mesure des bifurcations bronchiques. Certaines études ont montré un nombre de divisions bronchiques identique égal à 23 chez les deux espèces (Judge et al. 2014).

Chez l'Homme, on parle de dichotomie bronchique pour désigner la division des segments bronchiques le long de l'arbre bronchique : la division bronchique se fait de 2 en 2. Chez le porc, on a plutôt une division dite monopodiale : chaque bronche principale donne naissance à de plus petites bronches le long de celle-ci (Figure 17) (Judge et al. 2014).

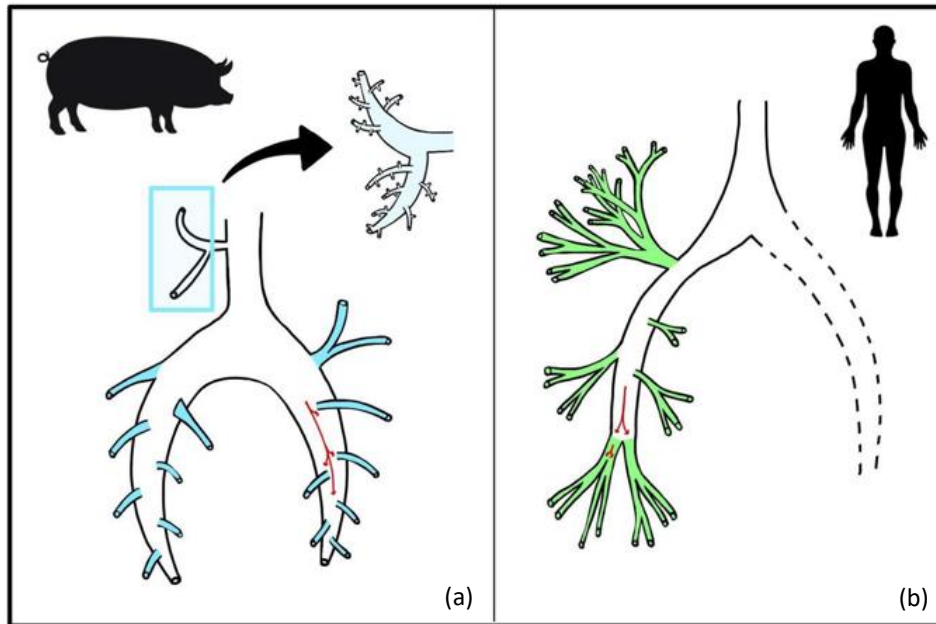


Figure 17 : Représentation schématique de la division bronchique (a) monopodiale chez le porc VS (b) bipodiale chez l'Homme. Source : Eloïse BESSON, réalisé sur GoodNotes.

Les poumons porcins sont similaires à ceux de l'Homme en termes de taille et de capacité fonctionnelle. On retrouve les mêmes mécanismes respiratoires et les échanges gazeux réalisés sont semblables. Cette similarité permet l'utilisation de méthodes telles que la bronchoscopie ou les lavages broncho-alvéolaires avec du matériel de médecine humaine (Judge et al. 2014).

Les poumons porcins comme humains sont hautement organisés et divisés en nombreux lobules pulmonaires bien définis et séparés par un septum ou interstitium pulmonaire. Ce dernier est constitué essentiellement de collagène. Chez l'Homme, cette trame de tissu conjonctif est incomplète et il existe des pores inter-alvéolaires appelés pores de Kohn. Ceux-ci rendent possible l'existence d'une ventilation collatérale entre alvéoles. Leur rôle et origine ne sont pas entièrement connus mais il semblerait qu'ils jouent un rôle important dans le maintien d'une bonne ventilation pulmonaire et celui du volume alvéolaire (Cordingley 1972). Chez le porc, la trame de collagène est plus complète et la ventilation inter-alvéolaire est donc moins présente (Judge et al. 2014; Liebich 2019).

L'organisation tissulaire pulmonaire est relativement semblable chez le porc et l'Homme. Les poumons sont recouverts par la plèvre viscérale, fine couche de tissu séreux. Leur parenchyme est principalement constitué d'un interstitium pulmonaire, tissu conjonctif riche en fibres élastiques qui supporte l'arbre bronchique et divise les poumons en différents lobules (Figure 18). Au niveau d'une bronche, on retrouve en bordure de la lumière un épithélium prismatique cilié pseudostratifié constitué de cellules caliciformes. L'épaisseur de cet épithélium diminue

à mesure que le diamètre des bronches diminue. Puis on trouve la lamina propria, un tissu conjonctif lâche. Elle est recouverte par une couche de cellules musculaire lisses. On observe enfin des glandes mixtes ainsi que du cartilage hyalin (Figure 19).

Le long de l'arbre bronchique, le diamètre des voies aériennes diminue et les bronches se divisent en bronchioles dépourvues de cartilage. Celles-ci donnent naissance à des canaux alvéolaires qui s'ouvrent sur des sacs alvéolaires dépourvus de cellules musculaires lisses (Bacha, Bacha 2012; Bodes, Martinez 2023; Liebich 2019).

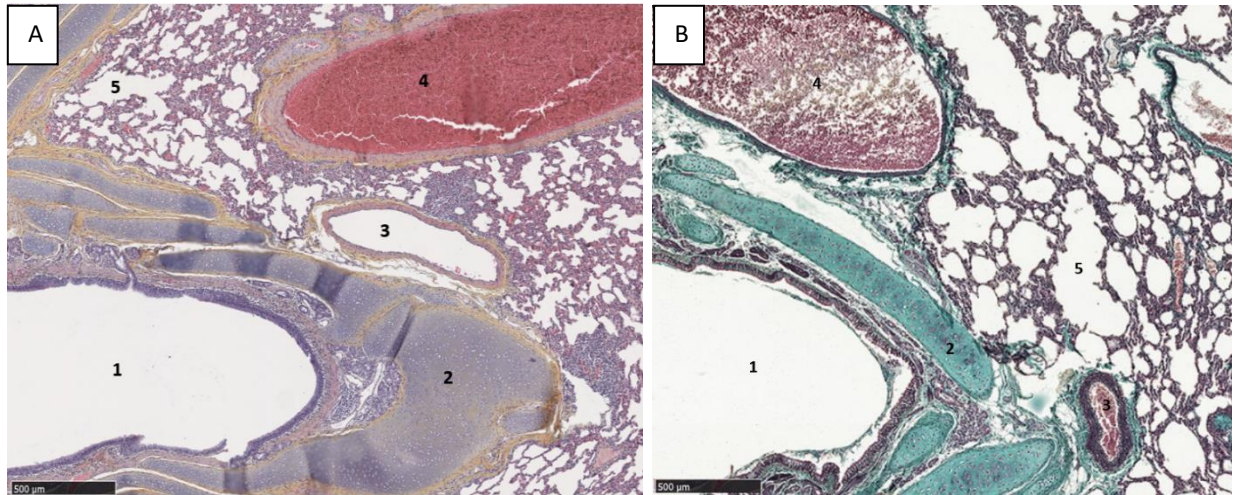


Figure 18 : Histologie pulmonaire comparée entre le porc (A) et l'Homme (B). Les échantillons présentés sont colorés au (a) HES, (b) Trichrome de Masson. 1 Lumière bronchique ; 2 cartilage hyalin ; 3 artère pulmonaire ; 4 veine pulmonaire ; 5 lumière alvéolaire. Barre d'échelle : 500µm. A : Source : Eloïse BESSON, NDP.view2 Zoom*6, coloration HES. B : d'après (Belaud-Rotureau 2019), Coloration Trichrome de Masson. La coloration verte permet de mettre en évidence les fibres de collagène.

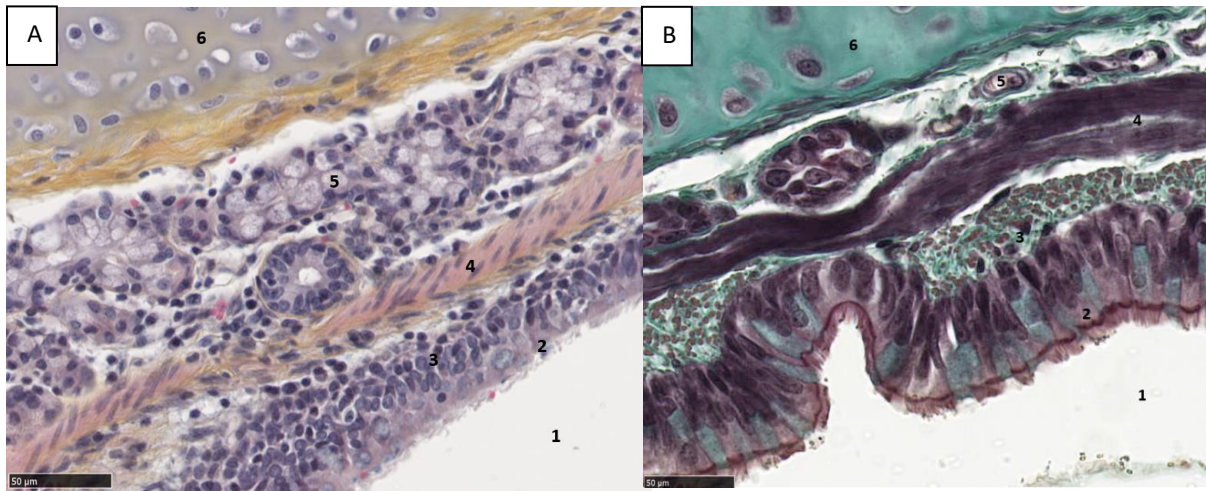


Figure 19 : Histologie pulmonaire comparée entre le porc (A) et l'Homme (B), focus sur les structures composant une paroi bronchique. Les échantillons présentés sont colorés au (a) HES, (b) Trichrome de Masson. 1 Lumière bronchique ; 2 Epithélium prismatique cilié pseudostratifié ; 3 Lamina propria ; 4 Muscle de Reissessen ; 5 glandes séro-muqueuses ; 6 Cartilage hyalin. Barre d'échelle : 50µm. A : Source : Eloïse BESSON, NDP.view2 Zoom*6, coloration HES. B : d'après (Belaud-Rotureau 2019), Coloration Trichrome de Masson. La coloration verte permet de mettre en évidence les fibres de collagène.

ii. Immunologie pulmonaire

Le système phagocytaire mononucléé pulmonaire peut se diviser en 3 catégories de cellules, définies selon leur localisation : les macrophages alvéolaires, les macrophages interstitiels et chez certaines espèces, les macrophages intravasculaires (MIP) (Figure 20). Ces cellules participent aux mécanismes de défense du poumon (Longworth 1997).

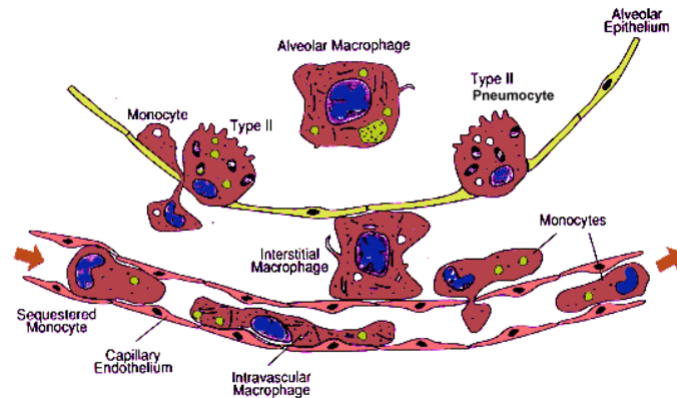


Figure 20 : Population cellulaire du système phagocytaire mononucléé pulmonaire. On retrouve 3 catégories de cellules selon leur localisation. Source : (Longworth 1997).

Il a été montré que chez le porc, le mouton ou encore le cheval, il existe une importante population de **macrophages intravasculaires** qui assurent la phagocytose des particules circulantes. Ceux-ci seraient issus de monocytes qui adhèrent de manière permanente à l'endothélium pulmonaire et s'y différencient en macrophages pulmonaires intravasculaires (MIP) (Brain et al. 1999).

Les MIP sont des cellules de grande taille (20 à 80 μm) et riches en organites (lysosomes, appareil de Golgi, mitochondries...). Elles possèdent de nombreux pseudopodes qui permettent un ancrage dans l'endothélium pulmonaire par interaction avec les cellules endothéliales (Figure 21) (Longworth 1997).

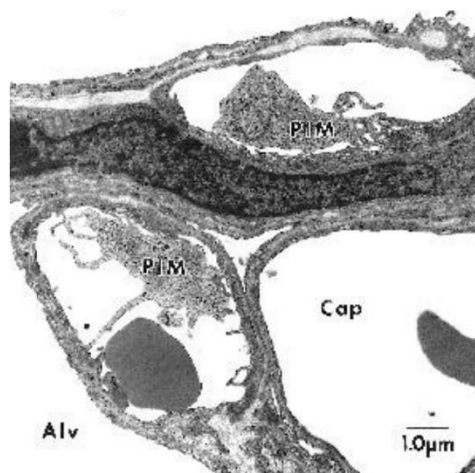


Figure 21 : Micrographie électronique pulmonaire d'agneau. Capillaires pulmonaires (Cap) entourés d'espaces intra-alvéolaires (Alv). Les Macrophages intravasculaires pulmonaires (PIM) sont en contact étroit avec l'endothélium capillaire via leurs pseudopodes. Barre d'échelle : 1 μm . Source : (Longworth 1997)

Chez un jeune porc âgé d'un mois, on estime que la population de macrophages intravasculaires occupe 25% de la lumière des capillaires (Longworth 1997). On considère que les MIP représentent la deuxième population cellulaire pulmonaire la plus importante après les macrophages alvéolaires (Bordet et al. 2018).

Chez l'Homme, des cellules mononucléées d'apparence similaire aux MIP ont été décrites. On considère que les MIP existent au sein des vaisseaux pulmonaires mais en très faible quantité par rapport aux espèces mentionnées précédemment. Ce type de macrophages peut se développer dans des conditions inflammatoires ou dans certaines pathologies chez l'Homme alors qu'il s'agit de cellules résidentes chez le porc. En comparaison avec les macrophages alvéolaires, les MIP sont considérés comme métaboliquement plus actifs. Les deux types cellulaires présentent une activité cytotoxique et bactéricide similaire, sécrètent des cytokines

pro-inflammatoires de nature semblable (Interleukine (IL) 1 et 2, Tumor Necrosis Factor (TNF) alpha...). Il semblerait que les MIP possèdent une activité tumoricide supérieure à celle des macrophages alvéolaires (Longworth 1997).

iii. Intérêts et perspectives de l'utilisation du porc comme modèle en pneumologie

Le porc constitue un modèle prometteur dans la recherche contre la mucoviscidose. Il s'agit de la maladie génétique mortelle la plus fréquente dans les pays occidentaux. Elle est due à une mutation autosomique récessive du gène codant pour la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator*). Il n'existe aujourd'hui pas de traitement causal, seulement symptomatique et l'espérance de vie moyenne des patients est comprise entre 40 et 50 ans. Des modèles porcins génétiquement modifiés portant la mutation la plus fréquente de ce gène ont été générés et vont fortement contribuer à la recherche contre cette pathologie. Les modèles murins pour cette maladie sont peu représentatifs car ils ne développent pas spontanément d'inflammation semblable à celle observée chez les patients humains (Guilbault et al. 2007; Pabst 2020).

2. Le système immunitaire. L'intérêt du porc comme modèle pré-clinique immunologique

2.1. Présentation succincte du système immunitaire

Le système immunitaire correspond à l'ensemble des processus et des mécanismes de défense mis en œuvre par l'organisme pour lutter contre les pathogènes et discriminer le « soi » du « non-soi ». Il est organisé en organes et tissus primaires (thymus et moelle osseuse) et secondaires (ganglions lymphatiques, rate, amygdales, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses ou MALT, système immunitaire de la peau). Il regroupe 2 types d'immunités distinctes.

L'immunité innée est la première réponse du système immunitaire. Il s'agit d'une réponse stéréotypée contre les agressions microbiennes et les agents physico-chimiques qui met en place tous les mécanismes ne faisant pas intervenir la lignée lymphocytaire. Elle comprend l'immunité constitutive, formée d'une grande diversité de barrières situées sur les principales voies d'entrée des pathogènes, et l'immunité de type inflammatoire.

Au sein du système immunitaire inné, on retrouve principalement des cellules phagocytaires qui jouent un rôle important dans les mécanismes de défense de l'hôte. Elles sont classées en 2 catégories : les phagocytes polynucléaires appelés granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles) et les phagocytes mononucléaires. Cette dernière catégorie regroupe les monocytes circulant du sang, les macrophages tissulaires, les pro-monocytes ainsi que leurs cellules souches dans la moelle osseuse (Male et al. 2007).

L'immunité adaptative est la seconde ligne de défense plus spécifique de l'organisme. Elle est variable d'un individu à l'autre. Les acteurs principaux en sont les lymphocytes B et T.

Les cellules lymphoïdes sont produites dans des organes lymphoïdes dits centraux. Elles y subissent une première phase de maturation puis passent dans la circulation sanguine et lymphatique afin de rejoindre des organes lymphoïdes dits périphériques ou secondaires. Les organes lymphoïdes primaires sont le siège de la lymphogénèse. La moelle osseuse hématopoïétique produit des cellules pré-B achevant leur première phase de maturation sur place et des pré-T qui iront coloniser le thymus. Les organes lymphoïdes secondaires sont le siège de l'immunogénèse, réaction des cellules B et T suite à la rencontre avec les antigènes qu'elles reconnaissent de façon spécifique. En résumé, les ganglions lymphatiques assurent le drainage de la lymphe, la rate est en lien avec la circulation sanguine et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses assurent la captation des antigènes pénétrant au travers des épithéliums de recouvrement. Il existe une collaboration entre les cellules de l'immunité innée et celles de l'immunité adaptative. Ainsi, les molécules secrétées par les différentes cellules phagocytaires agissent comme des signaux d'activation ou d'inhibition des lymphocytes de l'immunité adaptative (Male et al. 2007; Owen, Punt, Stranford 2013).

Pour notre étude expérimentale utilisant le porc comme modèle pré-clinique immunologique, nous avons choisi d'étudier plus spécifiquement les macrophages, ces cellules appartenant au système phagocytaire mononucléé. Dans ce contexte, nous avons choisi de décrire cette cellule en détail dans les paragraphes suivants.

2.2. Les macrophages

i. Découverte historique des macrophages

Les macrophages sont des cellules qui jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de l'immunité innée. En 1883, le zoologiste russe Elie Metchnikoff a été le premier à décrire les phagocytes et la phagocytose et est considéré comme le père de l'immunité cellulaire. Ses travaux lui ont valu l'obtention du prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1903. Il partagea ce prix avec Paul Ehrlich dont les travaux portaient sur l'immunité humorale (Figure 22) (Institut Pasteur 2016).

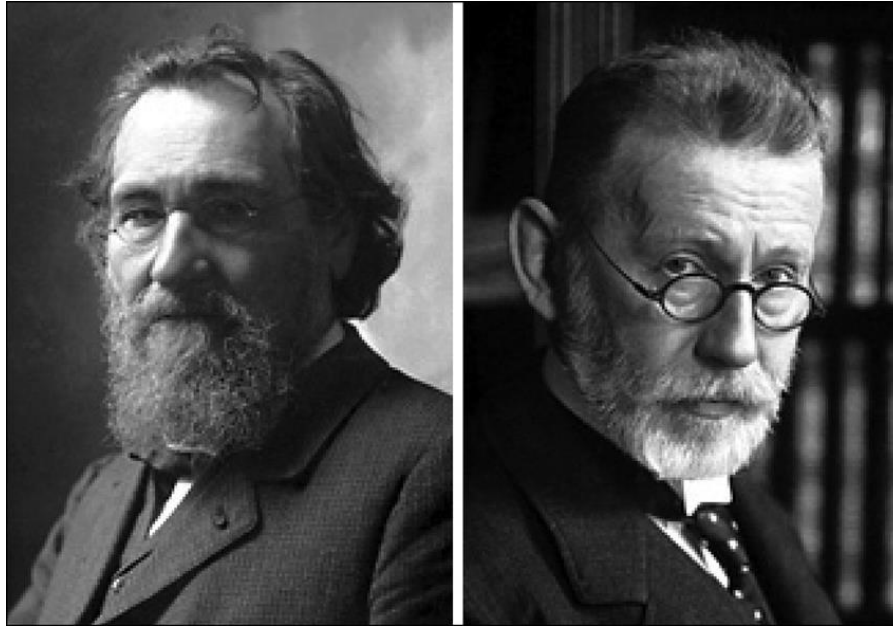


Figure 22 : Portraits d'Elie Metchnikoff et de Paul Ehrlich, pères des immunités cellulaire et humorale. Source : (Sherman 2011)

ii. Description morphologique

Le macrophage est une cellule de relativement grande taille : son diamètre est d'environ 15 μm (entre 10 et 25 μm). Sa morphologie est parfois rapprochée de celle d'un œuf au plat. Il s'agit d'une cellule mononucléaire qui possède un large noyau en son centre ; celui-ci peut être rond ou réniforme. Elle a un cytoplasme abondant avec un rapport nucléo-cytoplasmique inférieur à 1. Le cytoplasme du macrophage est riche en lysosomes, organites jouant un rôle dans la digestion intracellulaire. Il possède également de nombreuses mitochondries ainsi qu'un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique granuleux très développés. Ces éléments assurent une synthèse et une sécrétion massives de protéines. La membrane présente un aspect festonné avec de nombreuses microvillosités (van Furth et al. 1972; Tizard 2013)

Il existe des variations morphologiques entre les différents macrophages. A titre d'exemple, les macrophages alvéolaires pulmonaires possèdent un réticulum endoplasmique granuleux peu développé alors que leur cytoplasme est très riche en granules. Les microgliocytes (macrophages du système nerveux central) présentent eux un noyau plutôt ovoïde et leur cytoplasme forme de longs processus appelés dendrites (Figure 23) (Tizard 2013).

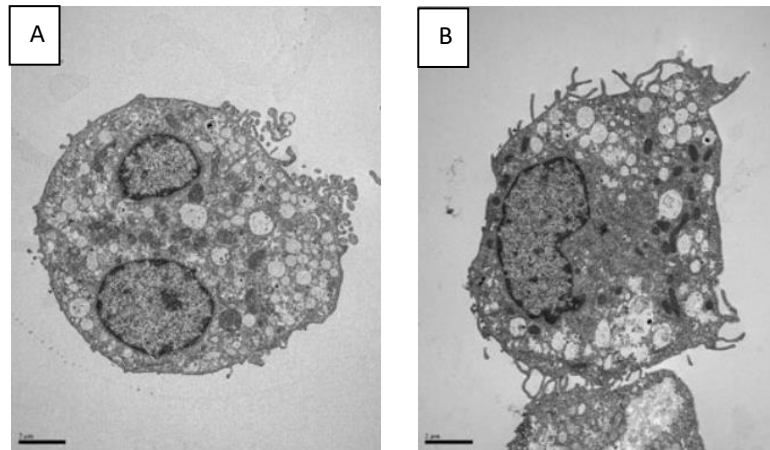


Figure 23 : Variations morphologiques des macrophages selon leur localisation. Images en microscopie électronique de (A) macrophage et (B) microglie, macrophage du système nerveux central. D'après (Lei et al. 2012).

iii. Origine et devenir des macrophages

On distingue deux grandes catégories de macrophages : les macrophages résidents tissulaires de longue durée et les macrophages inflammatoires. La plupart des **macrophages résidents** sont des macrophages dits embryonnaires : ils dérivent directement de la vésicule vitelline sans passer par l'état de monocytes (Owen, Punt, Stranford 2013; Male et al. 2007)

Les **macrophages inflammatoires** dérivent des monocytes. Monocytes et neutrophiles sont issus d'un précurseur commun. Chez l'Homme, le processus de développement des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes, ou cellules myéloïdes (on parle de myélopoïèse) débute dans le foie fœtal à environ six semaines de gestation. Ce phénomène est suivi de l'hématopoïèse durant laquelle les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules sanguines matures. Il est intéressant de noter qu'il a été récemment montré que certains macrophages tissulaires chez la souris dérivent de cellules souches non hématopoïétiques. Au cours de ce processus, une cellule souche hématopoïétique (HSC) peut s'engager dans deux grandes lignées. La première est la voie des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP de *Common Lymphoid Progenitor*) qui donne naissance aux lymphocytes B, T ainsi qu'aux cellules *Natural Killer* (NK). L'autre voie correspond à celle des progéniteurs myéloïdes-érythroïdes communs (CMP de *Common Myeloid-erythroid Progenitor*) qui aboutit aux cellules de la lignée érythroïde (tous les globules rouges) ainsi qu'aux granulocytes, monocytes et macrophages constituant la lignée myéloïde. En s'engageant dans telle ou telle voie, une HSC perd la capacité de se différencier en d'autres lignées cellulaires (Figure 24) (Mair et al. 2014).

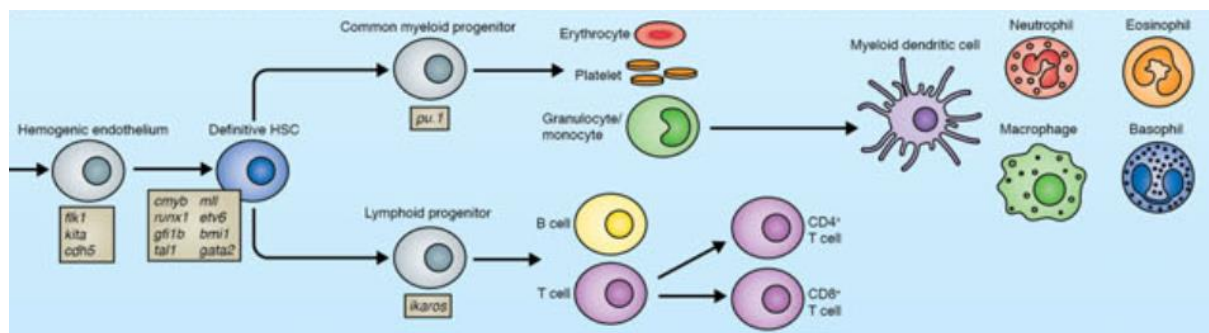


Figure 24 : Voies de différenciations des cellules souches hématopoïétiques. HSC, Hematopoietic Stem Cell. Les termes en italique correspondent aux gènes impliqués lors des différentes étapes de différenciation. D'après (Jagannathan-Bogdan, Zon 2013)

Les cellules qui s'engagent dans la voie des CMP prolifèrent tout d'abord en monoblastes. Ceux-ci se différencient en pro-monocytes qui donnent ensuite des monocytes matures et circulants. Les monocytes ont une durée de vie d'environ 72h dans les vaisseaux sanguins. Ces monocytes peuvent ensuite, à la faveur de stimuli inflammatoires, être recrutés et massivement mobilisés. Ils adhèrent alors à l'endothélium activé grâce à une série d'interactions. Puis la diapédèse (déplacement des cellules en dehors des capillaires) conduit à des interactions tissulaires locales ainsi qu'à l'accumulation de macrophages. Cette dernière s'accompagne de l'accélération de leur renouvellement et de leur changement de phénotype. Ce phénomène sera décrit plus loin. Le profil des macrophages est influencé par les différentes cytokines produites par les cellules NK, les lymphocytes ou les cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

iv. Les sous-types de monocytes

Chez l'Homme, les monocytes peuvent être divisés en 3 sous-types selon l'expression des marqueurs CD14 et CD16 : on distingue les monocytes classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$) ; les monocytes intermédiaires ($CD14^{++}CD16^{+}$) et les monocytes non-classiques ($CD14^{-}CD16^{++}$) (Cutolo et al. 2022). Les monocytes classiques représentent près de 90% des monocytes circulants en conditions physiologiques (Ziegler-Heitbrock 2014). Selon l'environnement et les cytokines présentes, certains monocytes peuvent se différencier préférentiellement en macrophages de phénotypes pro ou anti-inflammatoire (Figure 25).

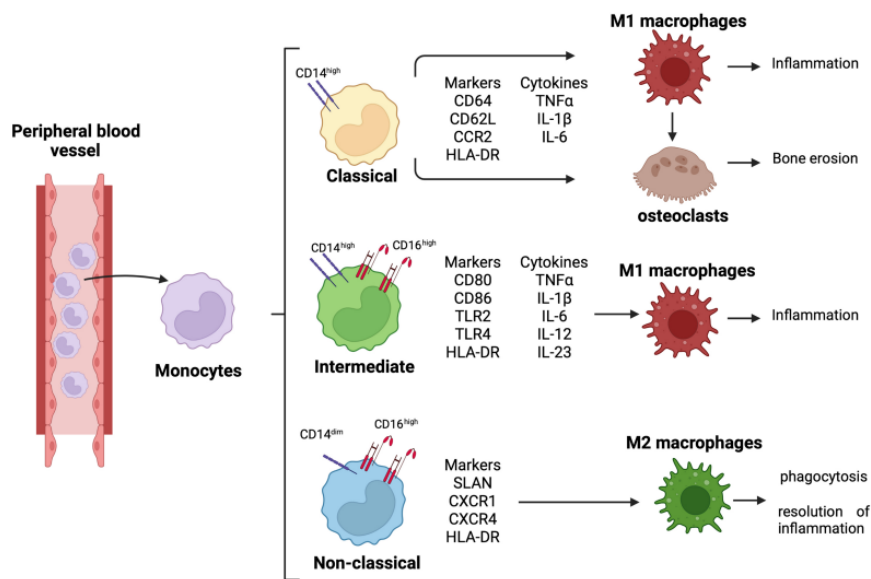


Figure 25 : Les différents sous-types de monocytes décrits chez l'Homme. Source : (Cutolo et al. 2022)

Chez le porc, la caractérisation des monocytes se fait selon l'expression ou non de l'antigène 2A10, molécule homologue du marqueur CD163 chez l'Homme (récepteur intervenant dans l'élimination du complexe hémoglobine-haptoglobine et exprimé par les monocytes et les macrophages). Les monocytes porcins CD163⁺ partagent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles avec leur équivalent humain CD14⁺⁺CD16⁺ (monocytes intermédiaires). Ils représentent plus de 50% de la population de monocytes. On considère que ce sont des cellules à tendance pro-inflammatoire, possédant une grande capacité de synthèse de cytokines pro-inflammatoires après stimulation par un lipopolysaccharide (LPS) (notamment TNF- α et IL-1) et possibilité de présentation d'antigènes aux lymphocytes T. Elles ont une plus grande expression de *Swine Leucocyte Antigen* (SLA) DR II (équivalent du CMH II) et de CD16 que les monocytes CD163⁻. A contrario, les monocytes CD163⁻ sont considérés comme équivalents aux monocytes CD14⁺⁺CD16⁻ (classiques). Après stimulation par un LPS, ils sont en mesure de synthétiser une cytokine anti-inflammatoire, l'IL-10. Ils présentent une plus grande expression de CD14 par rapport aux CD163⁺ (Chamorro et al. 2005 ; Fairbairn et al. 2011 ; Ziegler-Heitbrock 2014; Sánchez et al. 1999).

v. Principes d'activation et de polarisation des macrophages

Comme vu précédemment, les macrophages sont, en partie, issus de la différenciation des monocytes quand ils sortent de la circulation sanguine. Doués de propriétés phagocytaires (destruction des agents pathogènes, des cellules apoptotiques et nécrotiques), les macrophages sont également des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II, auprès des lymphocytes T auxiliaires (T helper).

Les monocytes et macrophages ne sont pas importants seulement pour l'initiation de l'inflammation. Ils exercent également un rôle prépondérant dans la mise en place, la résolution de l'inflammation ainsi que dans le remodelage tissulaire. Leur fonction est acquise en réponse aux cytokines émises localement et aux signaux rencontrés dans chaque tissu où deux populations de macrophages coexistent. Les propriétés fonctionnelles des macrophages varient selon leur distribution tissulaire et leur état d'activation ou « polarisation ». Il a été montré dans les années 1970 que les macrophages deviennent pleinement microbicides lorsqu'ils sont exposés à deux signaux successifs, une cytokine de type 1, par exemple l'interféron (IFN)- γ ou le TNF et un produit bactérien comme le LPS. Mais il est apparu par la suite que l'activation des macrophages par d'autres molécules conduit à un tableau quelque peu différent. Une classification M1/M2 des macrophages a été proposée ces dernières années sur le modèle de la polarisation lymphocytaire Th1/Th2 (Mantovani et al. 2004; Gordon, Martinez 2010).

a- Cycle de polarisation

Gordon et Martinez (2010) ont divisé en quatre étapes le cycle d'activation et de différenciation des macrophages.

Durant la première phase de **différenciation**, des monocytes sont recrutés et leur maturation aboutit à des macrophages. Cette maturation et leur phénotype à venir sont sous la dépendance de l'environnement. Le rapport entre la quantité de *Macrophage Colony-Stimulating factor* (M-CSF) et de *Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), d'acide rétinoïque ou encore de lipoprotéines peut déterminer les futurs phénotype et fonction du macrophage en maturation.

La maturation entamée au cours de cette première phase est complétée durant la seconde. La présence de cytokines particulières active préférentiellement les macrophages selon deux voies. La présence d'IFN- γ permet l'activation selon la « voie classique » et est à l'origine des macrophages M1, alors qu'en présence d'IL4 et/ou d'IL13, on aura plutôt une activation selon la « voie alternative » des macrophages appelés macrophages M2. On parle de phase de **priming** ou d'**amorçage**.

Dans un troisième temps, les macrophages acquièrent leur phénotype mature en réponse à des stimuli microbiens et opsoniques tels que des complexes d'anticorps. Il s'agit de la phase d'**activation**.

Enfin vient la phase de **résolution**. Si le macrophage survit à la phase inflammatoire, le taux de cytokines anti-inflammatoires augmente (IL-10, TGF- β ...) supprimant le potentiel pro-inflammatoire du macrophage. Cela s'accompagne de changements fonctionnels et le macrophage peut alors assurer un rôle de nettoyage de débris ou de réparation (Gordon, Martinez 2010; Mair et al. 2014 ; Genin et al. 2015).

Il est important de rappeler le terme **d'état de polarisation** et de souligner le fait que celui-ci n'est pas figé. La plasticité des macrophages leur permet d'intégrer de nombreux signaux et

de switcher entre M1 et M2 et inversement selon les changements environnementaux (présence de différentes cytokines, de facteurs de croissance, d'hypoxie...) (Figure 26) (Gordon, Martinez 2010).

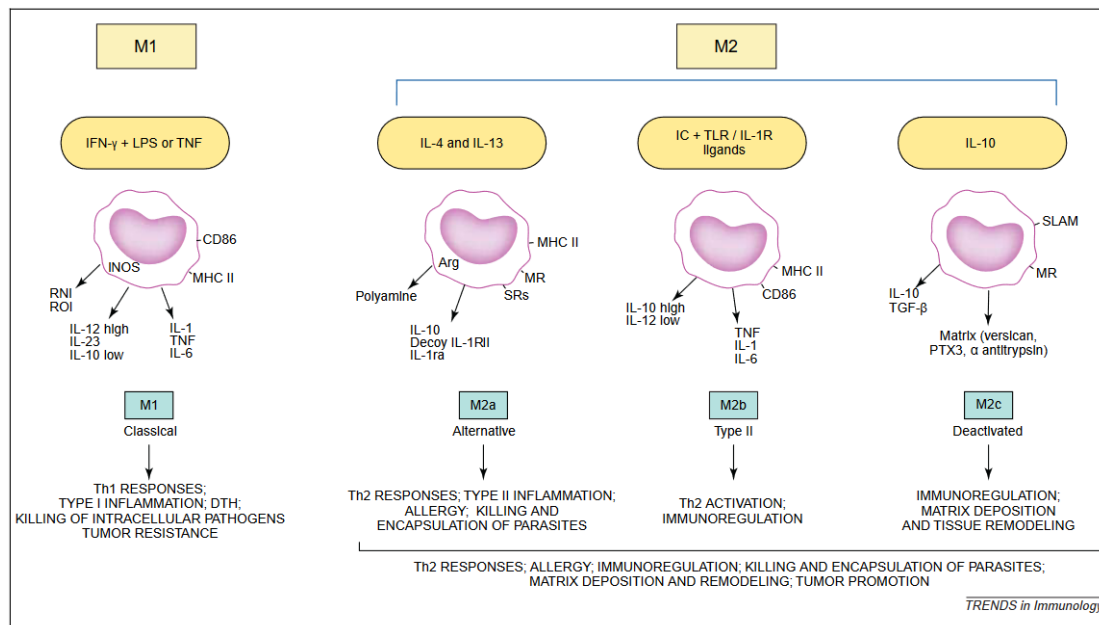


Figure 26 : Différents états de polarisation des macrophages : voies d'activation, produits de sécrétions et rôles. Source : (Mantovani et al. 2004)

b- Les macrophages M1 pro-inflammatoires

- Rôles et sécrétions

Les **macrophages M1** sont considérés comme **pro-inflammatoires**. Ils sont classiquement activés en présence d'IFN- γ , d'IL-1 β ou de LPS. Ils sont caractérisés par leur grande capacité de présentation d'antigènes et par la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 ou encore l'IL-12. Les cytokines produites sont de même nature chez le porc et chez l'Homme. Ils produisent également de grandes quantités de dérivés réactifs de l'oxygène ainsi que des composés azotés.

Les macrophages M1 sont capables d'inhiber la prolifération cellulaire, de phagocytter des micro-organismes et de causer des dommages tissulaires (Vogel et al. 2014; Boutilier, Elswa 2021; Mantovani et al. 2004; Genin et al. 2015).

Vogel (2014) a mis en évidence que les monocytes s'allongent lors de leur différenciation en macrophages de type M1 (Figure 27).

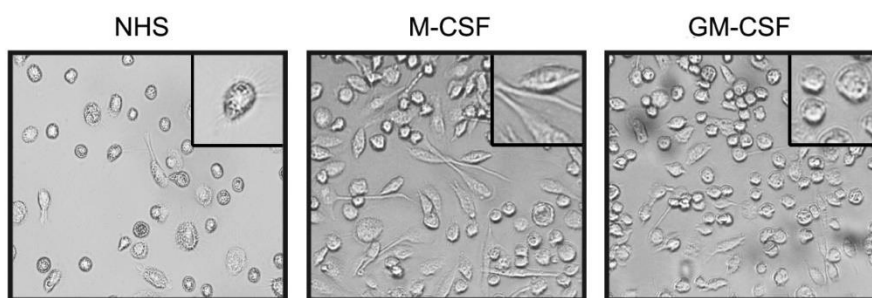


Figure 27 : Morphologie des macrophages selon l'environnement de maturation. NHS, témoin, M-CSF correspond à l'environnement favorable aux macrophages M1 plutôt allongés, GM-CSF favorable aux macrophages M2 plutôt ronds. Source : (Vogel et al. 2014)

- Biomarqueurs

Les macrophages interagissent avec leur environnement grâce à des protéines membranaires et des récepteurs. Les macrophages M1 favorisent la présentation des antigènes aux lymphocytes T *via* une augmentation de l'expression des CMH de classe I et II et des molécules de costimulation (Clusters de différenciation ou CD). Les CD correspondent à l'ensemble des glycoprotéines membranaires utilisées pour l'identification et l'immunophénotypage des cellules du système immunitaire. Chaque cellule hématopoïétique exprime à sa surface des marqueurs CD aux fonctions diverses. Quatre cent dix-neuf CD sont décrits chez l'Homme. Actuellement, on décompte 359 CD correspondants chez le porc (Dawson et al. 2013).

Certains CD sont exprimés spécifiquement par un sous-type de macrophage. L'utilisation de ces marqueurs permet donc de distinguer un macrophage M1 d'un macrophage M2. Chez l'homme, sont cités dans la littérature comme marqueurs des macrophages M1 les marqueurs CD40, CD64, CD68, CD80, CD86 (Genin et al. 2015 ; Li et al. 2023 ; Badylak et al. 2008 ; Cutolo et al. 2022 ; Boutilier, Elswa 2021 ; Vogel et al. 2014). A noter que le marqueur CD68 est également utilisé pour le marquage non spécifique des macrophages tissulaires (Barros et al. 2013; Badylak et al. 2008).

En 2018, Dawson et Lunney ont présenté des tableaux récapitulatifs des connaissances sur les différents CD existants et leur présence ou non chez le porc, la souris et l'Homme, selon les données actuelles de la littérature (Tableau II). Les marqueurs des macrophages M1 cités plus haut sont reconnus chez l'Homme.

	CD40	CD64	CD68	CD80	CD86
Porc	+	+	+	-	-
Homme	+	+	+	+	+
Souris	+	+	+	+	+

Tableau II : Présence ou non des CD d'intérêts, considérés comme marqueurs des macrophages M1 de l'Homme, chez le porc et la souris selon la littérature actuelle. D'après (Dawson, Lunney 2018)

c- Les macrophages M2 anti-inflammatoires

- Rôles et sécrétions

Les **macrophages M2** sont considérés comme **anti-inflammatoires**. On les divise en 3 catégories selon l'environnement présent qui détermine leur activation et donc leur rôle. Les macrophages de type M2a sont obtenus après stimulation par l'IL-4 ou l'IL-13 ; le type M2b après stimulation par des immuns complexes associés à l'IL-1 ou LPS et le type M2c par stimulation par l'IL-10, le *Transforming Growth Factor* (TGF) ou les glucocorticoïdes (Mantovani et al. 2004 ; Vogel et al. 2014).

Les macrophages M2 sont dits immunosuppresseurs, ils favorisent l'angiogenèse, le remodellement ou la réparation tissulaires grâce à la sécrétion de molécules comme le TGF ou le *Fibroblast Growth Factor* (FGF).

Il a été montré que ce type de macrophage est largement représenté au sein des tumeurs malignes et que leur action facilite le développement tumoral (Genin et al. 2015).

La morphologie des macrophages M2 est plutôt circulaire, par opposition à la forme allongée des M1 (Figure 27) (Vogel et al. 2014).

- Biomarqueurs

Des biomarqueurs des macrophages M2 chez l'Homme sont décrits dans la littérature. On retrouve notamment le CD206 (Genin et al. 2015 ; Boutilier, ElSawa 2021). Le CD206, également connu sous le nom de récepteur du mannose C de type 1 (MRC1), est une protéine de surface cellulaire présente en abondance dans des populations sélectionnées de macrophages et de cellules dendritiques. Le CD206 est habituellement exprimé par le sous-type M2 des macrophages mais pas par le sous-type M1 et sert donc de marqueur utile à l'identification du phénotype M2 (Tableau III)(Martinez et al. 2008).

Sont également cités le CD163 et le Mannose Receptor (MR) (Genin et al. 2015) (Boutilier, ElSawa 2021). Nous pouvons donc noter une différence entre le porc et l'Homme : nous avons vu précédemment que les macrophages CD163⁺ sont considérés comme macrophages de type M1 chez le porc en lien avec leur activité alors que chez l'Homme, ce marqueur est utilisé pour les macrophages M2.

	CD163	CD206
Porc	+	+
Homme	+	+
Souris	+	+

Tableau III : Présence ou non des CD d'intérêts, considérés comme marqueurs des macrophages M2 de l'Homme, chez le porc et la souris selon la littérature actuelle. D'après (Dawson, Lunney 2018)

d- Bilan : principales caractéristiques des états de polarisation des macrophages



Type de macrophage	Sous-type	Activation	Marqueurs	Sécrétions de cytokines
M2 	M2a	IL-4 IL-13	CD163 CD206	IL-10 IL1-rA
	M2b	Complexes immuns + IL-1 LPS		TNF IL-1 IL-6 IL-10
	M2c	IL-10 TGF Glucocorticoïdes		TGFβ
M1 	/	IFN-γ IL-1β LPS	CD40 CD64 CD68 CD80 CD86	TNFα IL-1β IL-6 IL-12

Tableau IV : Principales caractéristiques des états de polarisation des macrophages. Source : Eloïse Besson

vi. Rôle des macrophages

Les macrophages sont des cellules possédant plusieurs fonctions. Certains sont résidents tissulaires de longue durée et jouent un rôle important dans l'homéostasie tissulaire. D'autres participent à la réponse immunitaire innée et subissent un certain nombre de modifications lorsqu'ils sont stimulés par leur rencontre avec des agents pathogènes ou des lésions tissulaires. Ils jouent un rôle de phagocyte et également de cellule présentatrice d'antigènes capables d'activer les lymphocytes T. Suite à leur activation, les macrophages inflammatoires sont plus efficaces que ceux au repos pour l'élimination des agents pathogènes : ils présentent une plus grande capacité phagocytaire et voient leur possibilité de sécrétion de médiateurs inflammatoires et cytotoxiques augmenter (Owen, Punt, Stranford 2013).

Nous allons détailler ces trois rôles principaux attribués aux macrophages.

a- *Phagocytose*

La phagocytose est un processus réalisé par les phagocytes lors d'intrusion de microorganismes pathogènes. Ces bactéries, virus ou encore champignons expriment à leur surface des motifs appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP de *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Les PAMPs induisant la phagocytose sont généralement des composants de la paroi cellulaire tels que les LPS. Les phagocytes comme les macrophages

présentent à leur surface de nombreux récepteurs permettant la reconnaissance de ces motifs moléculaires particuliers : on les appelle les *Pattern Recognition Receptor* (PRR). Nous pouvons citer notamment les *Toll-Like Receptors* (TLR) ou le *mannose Binding Receptor* CD206. Les PRRs reconnaissent donc les PAMPs mais peuvent également reconnaître des protéines solubles liées aux surfaces des micro-organismes : les opsonines. Ce phénomène, appelé opsonisation (du grec « rendre savoureux ») constitue une autre voie d'activation de la phagocytose. Ces opsonines sont reconnues par des récepteurs spécifiques comme le CD64 retrouvé principalement sur les macrophages et dans une moindre mesure sur les neutrophiles (Tizard 2013).

À la suite de la reconnaissance de ces éléments, des voies de signalisation sont activées. Celles-ci provoquent la polymérisation de l'actine aboutissant à la formation d'extensions de la membrane autour des particules microbiennes. Ces particules sont internalisées, l'ensemble constituant un phagosome. Cette vésicule va ensuite fusionner avec un lysosome intracellulaire pour former un phagolysosome. Celui-ci contient un ensemble d'agents antimicrobiens permettant la destruction des particules microbiennes par des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs (Figure 28) (Owen, Punt, Stranford 2013).

Outre l'élimination des pathogènes étrangers, la phagocytose contribue également au recyclage des cellules de l'organisme et à l'élimination des cellules mortes ayant subi l'apoptose (efferocytose). Ceci est rendu possible grâce à la reconnaissance par les macrophages des Motifs moléculaires associés aux dégâts en surface de ces cellules (DAMP de *Damaged-Associated Molecular Pattern*). Enfin, les macrophages de la rate et ceux du foie (cellules de Kuppfer) reconnaissent et dégradent les globules rouges endommagés ou vieux (Owen, Punt, Stranford 2013).

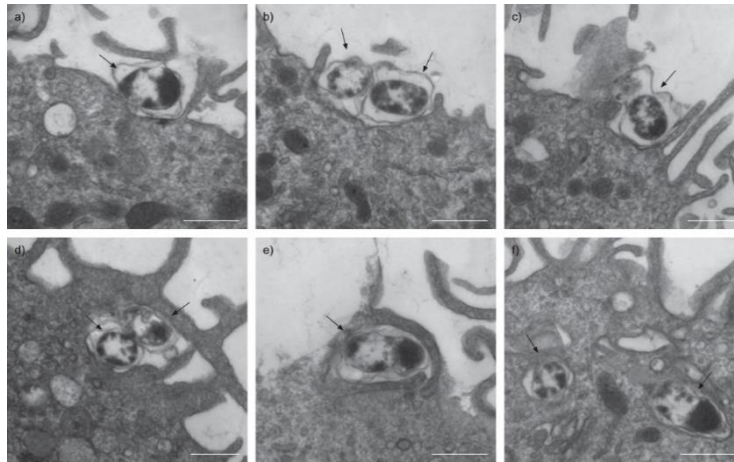


Figure 28 : Images en microscopie électronique d'un macrophage phagocytant *Haemophilus Influenzae*. Les flèches indiquent les bactéries. (a) Une bactérie en surface d'un macrophage ; (b) et (c) formation d'une vésicule d'endocytose autour de la bactérie ; (d) et (e) la bactérie est complètement entourée par un pseudopode ; (f) la bactérie est alors internalisée dans le cytoplasme au sein d'un phagosome. Barre d'échelle : 5500 nm. D'après (Taylor et al. 2010).

b- Présentation de l'antigène : voie exogène et CMHII

Le macrophage fait partie des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Après internalisation d'un antigène, celui-ci est dégradé en peptides en suivant la voie d'apprêtement endocyttaire : les endosomes précoces, les endolysosomes ou endosomes tardifs et les lysosomes. Le pH décroît au fur et à mesure de l'avancée de l'antigène dans ces différentes entités. La dégradation finale de la protéine s'effectue au sein d'endosomes spécifiques aux CPA contenant les molécules du CMH de classe II. Les oligopeptides issus de la dégradation sont associés aux CMHII puis exposés en surface de la cellule. Ce complexe CMH-antigène est reconnu par des récepteurs à la surface des lymphocytes T CD4. La zone de contact entre la CPA et la cellule T est appelée synapse immunologique (Male et al. 2007; Pastoret, Govaerts, Bazin 1990; Owen, Punt, Stranford 2013).

c- Immunomodulation et production de cytokines

Les macrophages sont capables de synthétiser des molécules appelées cytokines qui assurent la communication entre les différentes cellules du système immunitaire. On répartit actuellement les cytokines en six groupes. A l'issue de l'ingestion de pathogènes, les macrophages acquièrent un phénotype inflammatoire qui se caractérise par la production de ces médiateurs solubles.

La famille de l'interleukine-1 comprend notamment l'IL-1 α et l'IL-1 β qui peuvent être synthétisées principalement par les macrophages M1. Ce sont essentiellement des cytokines pro-inflammatoires. Elles induisent une augmentation locale de la perméabilité des capillaires ainsi qu'une amplification de la migration des leucocytes vers les tissus infectés. Elles possèdent également des effets systémiques : elles stimulent la production par le foie de

protéines de phase aigüe comme les interférons de type I ou l'IL-6 et entraînent l'apparition d'une fièvre systémique. Enfin, elles jouent un rôle dans l'activation des lymphocytes lors du déclenchement de la réponse immunitaire adaptative.

La famille des hématopoïétines correspond aux cytokines de classe I. Les macrophages M1 synthétisent de l'IL-6 et de l'IL-12 qui appartiennent à cette famille. L'IL-6 joue un rôle dans la différenciation des cellules B et dans l'induction des protéines de phase aigüe. L'IL-12 est un facteur important : il favorise la différenciation de la sous-population Th1, la production d'interféron gamma par les lymphocytes T et les cellules NK et l'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T.

La famille des interférons regroupe les cytokines de classe II. Elle comprend par exemple l'IFN- γ qui favorise la polarisation des macrophages M1.

La famille des facteurs de nécrose des tumeurs comprend le TNF α produit par les macrophages M1. Il s'agit d'un médiateur puissant des fonctions immunes et inflammatoires qui possède une action cytotoxique. Il favorise également l'angiogenèse et induit des protéines de phase aigüe.

On retrouve enfin la famille de l'interleukine-17 dont les membres favorisent l'accumulation et l'activation des neutrophiles ainsi que la famille des chimiokines possédant des fonctions chemoattractantes (Owen, Punt, Stranford 2013) (Male et al. 2007).

vii. Intérêt de l'utilisation du porc comme modèle pré-clinique en immunologie

La souris a été longtemps largement utilisée comme modèle en immunologie. Néanmoins, il existe de grandes différences entre la souris et l'Homme au niveau immunologique rendant ce modèle peu recevable. Par exemple, la population de cellules immunitaires circulantes compte près de 50 à 70% de neutrophiles chez l'Homme contre seulement 10 à 25% chez la souris (Fairbairn et al. 2011).

Des études réalisées chez la souris, le porc et l'Homme ont mis en évidence une similarité majeure entre ces deux dernières espèces. La stimulation des macrophages murins par un LPS induit la synthèse de l'enzyme synthétase inductible de NO (iNOS de *inductible Nitric Oxide Synthase* ou NOS2). Cette enzyme agit sur la L-arginine en utilisant la NADPH oxydase, complexe enzymatique propre aux phagosomes, pour donner la L-citrulline et le monoxyde d'azote (NO), agent antimicrobien très efficace. Chez l'Homme et le porc, les macrophages produisent dans la même situation l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Cette enzyme catabolise la conversion du L-tryptophane en kynurénine. Ce métabolite permet d'activer des facteurs d'immunosuppression et son expression est augmentée dans les maladies inflammatoires chroniques (Mair et al. 2014; Owen, Punt, Stranford 2013; Tizard 2013; Salminen 2022).

La publication du génome porcin a permis de mettre en évidence les nombreuses similitudes existant entre les immunomes porcin et humain, supérieures à celles entre souris et humain : l'immunome porcin ressemble à plus de 80 % à celui de l'Homme pour certaines portions


étudiées contre moins de 10 % pour la souris. Il a également été montré que de nombreux anticorps humains reconnaissent des antigènes en surface de macrophages porcins par réactions croisées. De plus, il existe une claire orthologie entre les gènes des CDs de l'Homme et du porc. Cela facilite la reconnaissance de cellules immunitaires chez le porc en utilisant des antigènes humains facilement accessibles à l'achat. (Fairbairn et al. 2011; Dawson, Lunney 2018).

De plus en plus d'équipes de recherche en immunologie se tournent donc vers le porc comme modèle pré-clinique. De nombreux chercheurs étudient les monocytes et macrophages porcins à l'aide de marqueurs spécifiques de certaines cellules immunitaires. Ainsi identifiées, les cellules sont fréquemment classées par cytométrie de flux (Singleton et al. 2016; Chamorro et al. 2005; Bordet et al. 2018).

Il ne faut cependant pas oublier que des différences subsistent entre le porc et l'Homme. Par exemple, des macrophages intravasculaires pulmonaires sont présents chez le porc en conditions physiologiques, alors que chez l'Homme, ceux-ci ne se développent qu'en conditions inflammatoires (Bordet et al. 2018; Meurens et al. 2012).

3. Bilan : caractéristiques communes entre l'Homme et le porc

Notre étude bibliographique a permis de mettre en évidence les principales similitudes existantes entre le porc et l'Homme justifiant ainsi l'utilisation du porc comme modèle pré-clinique dans différentes disciplines. Le Tableau V récapitule les différents éléments présentés. L'utilisation d'un modèle animal présentant des caractéristiques anatomiques et physiologiques proches de celles de l'Homme permet d'extrapoler les résultats obtenus lors des recherches pré-cliniques.

Organe/entité		Similitudes et différences principales
<p style="text-align: center;">COEUR</p> 	⊕	<p>Rapports <i>poids corps/poids cœur</i> proches (Grandmougin et al. 2016a) Dominance coronaire droite (Lelovas, Kostomitsopoulos, Xanthos 2014) Développement spontané d'athérosclérose (Tedgui 2017)</p>
	⊖	<p>Forme de cœur Valentin chez le porc VS trapézoïde chez l'Homme (CRICK et al. 1998) 2 veines pulmonaires chez le porc VS 4 à 5 chez l'Homme (Grandmougin et al. 2016a) Veines caves perpendiculaires chez le porc VS parallèles chez l'Homme (CRICK et al. 1998) Sinus coronaire drainé par la veine azygos chez le porc (Alejandro Gómez, Ballesteros, Stella Cortés 2015)</p>






FOIE 	+	<p>Nombre de lobes identique (4 lobes divisés en 8 segments) (Ntonas et al. 2020)</p> <p>Système vasculaire artériel identique, système veineux proche (Ntonas et al. 2020)</p> <p>Système biliaire anatomiquement et fonctionnellement identique (Ntonas et al. 2020)</p> <p>Xéno greffon d'intérêt (Cross-Najafi et al. 2022)</p>
	-	<p>Lobules nettement individualisés chez le porc VS lobules non cloisonnés chez l'Homme (Ntonas et al. 2020)</p>
POUMONS 	+	<p>Taille et capacité fonctionnelle pulmonaire semblables (Fairbairn et al. 2011)</p> <p>Possibilité d'utiliser les techniques d'humaine (endoscopie, lavages broncho-alvéolaires...) (Fairbairn et al. 2011)</p> <p>Bon modèle d'étude de la mucoviscidose, développement de symptômes similaires aux symptômes humains (Pabst 2020)</p>
	-	<p>4 lobes droits chez le porc VS 3 lobes droits chez l'Homme (Meurens et al. 2012)</p> <p>Division bronchique monopodiale chez le porc VS bipodiale chez l'homme (Judge et al. 2014)</p> <p>Présence d'une importante population de macrophages intravasculaires pulmonaires chez le porc (Longworth 1997)</p>
SYSTEME IMMUNITAIRE 	+	<p>Jusqu'à 80 % de similitudes pour certaines portions de l'immunome entre le porc et l'Homme (Dawson et al. 2013)</p> <p>Claire orthologie entre les CD's humains et porcins (Dawson et al. 2013)</p> <p>Possibilité de réactions croisées avec des anticorps humains (Fairbairn et al. 2011)</p> <p>Même comportement des macrophages humains et porcins en cas de stimulation par un LPS (Mair et al. 2014)</p>
	-	<p>Présence de macrophages intravasculaires pulmonaires en conditions physiologiques chez le porc (Bordet et al. 2018)</p>
GENOME 	+	<p>Séquençage complet du génome porcine disponible</p> <p>Trois fois plus de similitudes entre les séquences nucléotidiques du porc et de l'Homme qu'entre celles de l'Homme et de la souris (Walters et al. 2012)</p>
NŒUDS LYMPHATIQUES 	+	<p>Dynamique générale de circulation lymphatique semblable (Pabst 2020)</p>
	-	<p>Organisation histologique différente : nœud lymphatique « inversé » chez le porc (Pastoret, Govaerts, Bazin 1990)</p>

Tableau V : Principales similitudes et différences entre l'Homme et le porc concernant les différents organes/entités d'intérêts. Source : Eloïse Besson

Deuxième partie :

Étude expérimentale

I. Etude du profil des macrophages dans un modèle porcin de choc septique

1. Le sepsis

1.1. Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le sepsis est responsable d'un décès sur cinq dans le monde et entraîne 11 millions de victimes chaque année, soit un décès toutes les 2,8 secondes. On estime à 49 millions le nombre de patients atteints en 2017, la moitié étant des enfants. En France, le nombre de cas annuels de sepsis d'origine bactérienne est estimé à 300 000, auxquels s'ajoutent ceux d'origine fongique ou virale. Le taux de mortalité des patients hospitalisés pour sepsis est de 25% et peut atteindre 50% en cas de **choc septique**, un **sous-groupe du sepsis comportant d'importantes anomalies circulatoires et métaboliques** (Singer et al. 2016). On estime à plus de 60 000 le nombre de décès annuels en France. Un doublement du nombre de cas est attendu d'ici cinquante ans, en lien avec le vieillissement de la population (Global Sepsis Alliance 2020; World Health Organization 2020; Guillemot 2021).

Malgré ces chiffres, le sepsis reste encore mal appréhendé par les professionnels de santé publique. Il s'agit d'une affection polymorphe à l'origine d'altérations circulatoires et biologiques dont les mécanismes sont toujours peu connus et mal compris. Le sepsis est également une affection onéreuse : on estime à 16000 euros le coût moyen d'une hospitalisation pour sepsis (Ministère de la Santé et de la prévention 2023b).

Les données relatives au sepsis chez nos carnivores domestiques sont pauvres. Chez les chats, on rapporte un taux de mortalité lié au sepsis allant jusqu'à 40% pouvant même atteindre 70% chez les chiens. Le sepsis apparaît également en médecine vétérinaire comme une cause importante de décès chez les animaux hospitalisés (Montealegre, Lyons 2021).

1.2. Définition et étiologie

Le terme anglo-saxon sepsis vient du verbe grec [σηπω] sepo, littéralement « je pourris ». La définition de ce terme a subi de nombreuses évolutions depuis les années 90. En effet, le sepsis est une pathologie complexe difficile à appréhender. En 1992, une première conférence de consensus de l'ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine) a tout d'abord défini le sepsis comme étant la réponse inflammatoire systémique à l'infection (*Systemic Inflammatory Response Syndrome* ou SIRS). La notion de SIRS est définie par la présence d'au moins deux des critères suivants : Température > 38°C ou < 36°C, fréquence respiratoire > 20/mpm (mouvements par minute), fréquence cardiaque >90 bpm (battements par minute) et numération leucocytaire > 12 000/mm³ ou < 4 000/mm³. Cette définition reposait uniquement sur des symptômes cliniques et des critères diagnostiques. Ceux-ci ont finalement été considérés comme trop sensibles et trop peu spécifiques : un nombre important de patients remplissant ces critères étaient considérés comme en choc septique sans que cela ne soit réellement le cas (Nessler et al. 2017; Magnin 2021).

C'est ainsi qu'en 2010, deux nouvelles définitions ont été adoptées lors du Congrès de la Global Sepsis Alliance. Ces définitions reposaient plus sur la physiopathologie du sepsis que sur des critères cliniques. Le sepsis est alors défini comme « une affection potentiellement mortelle qui survient lorsque la réponse de l'organisme face à une infection est à l'origine de lésions tissulaires et organiques ». D'un point de vue moléculaire, il est caractérisé par « une activation inadaptée de la réponse immunitaire innée induite par la libération de molécules par l'hôte et/ou l'agent pathogène » (Global Sepsis Alliance 2010). On retrouve bien les critères de gravité de la pathologie, la notion de réponse inadaptée de l'organisme et le rôle clé de l'immunité innée (Nessler et al. 2017; Global Sepsis Alliance 2020).

Depuis, les recherches concernant le sepsis ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes immunologiques, biochimiques et circulatoires mis en jeu. Une nouvelle définition a été proposée en 2015 lors de la troisième conférence de consensus international Sepsis-3, toujours utilisée aujourd'hui : le **sepsis est « une dysfonction d'organe secondaire à une dérégulation de la réponse de l'hôte à l'infection et menaçant le pronostic vital »**. La notion de dysfonction d'organe, sous-entendue dans la définition de 2010, est l'élément symptomatique clé de la pathologie. Un score a été mis en place afin de mesurer cette dysfonction d'organe. Son but est de mieux discriminer les patients atteints d'une infection chez lesquels les symptômes observés sont en lien avec une réponse physiologique de l'organisme de ceux en choc septique chez lesquels la réponse est exagérée. Il s'agit du score SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment). Il s'appuie sur six sous-scores, un pour chaque classe : respiratoire, neurologique, cardiovasculaire, hépatique, rénal et coagulation (Figure 29). Le score Quick SOFA est davantage utilisé dans les unités de soins intensifs. Ce score évalue 3 points et varie de 0 à 3 : fréquence respiratoire ≥ 22 /mpm, altération du statut mental et pression artérielle systolique ≤ 100 mmHg. Un score de 2 ou 3 en début de prise en charge d'une infection est associé à un taux de mortalité plus élevé ou à un séjour prolongé en soins intensifs (Nessler et al. 2017).

SOFA (SEQUENTIAL ORGAN FAILURE ASSESSMENT)					
SYSTEM	SCORE				
	0	1	2	3	4
Respiration PaO ₂ /FIO ₂ , mm Hg	≥400	300-399	200-299	100-199 w/ respiratory support	<100 w/respiratory support
Coagulation Platelets, X 10 ³ /μL	≥150	100-149	50-99	20-49	<20
Liver Bilirubin, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Cardiovascular	MAP ≥ 70 mm Hg	MAP < 70 mm Hg	Dopamine ≤ 5 or dobutamine (any dose)	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤ 0.1 or norepinephrine ≤ 0.1	Dopamine >15 or epinephrine > 0.1 or norepinephrine > 0.1
Central nervous system Glasgow Coma Scale score	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal Creatinine, mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5.0
Urine output, mL/d				200-499	<200

Figure 29 : Présentation du score SOFA, utilisé pour évaluer la dysfonction multi-organique chez les patients suspects ou atteints de sepsis. Source : (Maigur, 2019)

On retrouve une sous-catégorie de sepsis appelée **choc septique** caractérisant un **sepsis associé à une hypotension réfractaire nécessitant l'administration de vasopresseurs pour maintenir une Pression Artérielle Moyenne (PAM) supérieure à 65mmHg associée à une lactatémie supérieure à 2mmol/L malgré la réalisation d'une fluidothérapie adaptée**. Les défaillances observées et les anomalies du métabolisme sont très sévères dans le cas d'un choc septique et sont associées à une mortalité augmentée de 40% par rapport à un sepsis, soit 60% (Jarczak, Kluge, Nierhaus 2021).

L'origine de l'infection primaire peut être variée. Les maladies diarrhéiques et les infections du bas appareil respiratoire sont les points d'origine principaux du sepsis. Nous pouvons également citer les infections des sphères génitale, urinaire ou des tissus mous (King et al. 2014; World Health Organization 2020). Le sepsis peut également survenir après un acte invasif tel qu'une chirurgie (Guillemot 2021).

Les agents infectieux les plus fréquents sont les bactéries (majoritairement des bactéries Gram +), mais des infections fongiques ou virales peuvent également être impliquées (King et al. 2014). Le SARS-Cov-2 a par exemple été à l'origine de nombreux cas de sepsis récemment.

Ce syndrome touche généralement des individus immunodéprimés ou d'âges extrêmes (nouveau-nés ou personnes âgées) (Guillemot 2021).

1.3. Symptômes

Le sepsis est une urgence médicale qui peut se manifester par divers symptômes. Chez l'Homme, on retrouve par exemple de la fièvre avec frissons, une altération du statut mental, des difficultés respiratoires avec tachypnée, une tachycardie, une diminution de l'émission d'urine, des extrémités froides, un pouls faible ou encore des douleurs importantes (Figure 30). Reconnaître ces signes est la première étape indispensable pour un diagnostic et une prise en charge précoces du sepsis (World Health Organization 2020).



Figure 30 : Exemples de symptômes pouvant être liés au sepsis chez l'Homme. Source : (Ministère de la Santé et de la prévention 2023b)

Les manifestations cliniques d'une septicémie chez nos carnivores domestiques peuvent être assez frustrées. On retrouve une hyper ou hypothermie, tachypnée, tachycardie (ou bradycardie chez les chats) ou encore une altération du statut mental (Montealegre, Lyons 2021; Greiner, Wolf, Hartmann 2008).

On décrit également un ensemble de symptômes pouvant être observés chez des patients ayant été traités pour un sepsis : on parle de Post Sepsis Syndrome (PSS) (Figure 31). Ce PSS peut avoir un retentissement d'intensité et de durée variables sur la qualité de vie. (Global Sepsis Alliance 2020). Ainsi, environ 25 % des patients qui survivent à un sepsis présentent des altérations cognitives plus de trois mois après (Guillemot 2021).



Figure 31 : Exemples de symptômes observés chez les patients ayant été traités pour sepsis. Source : (Global Sepsis Alliance 2020)

Le sepsis est donc un problème de santé majeur, comme défini par l'OMS. De nombreuses campagnes de sensibilisation aux risques et à la prévention du sepsis sont organisées afin d'éduquer les populations pour limiter au maximum le nombre de cas. En effet, la meilleure des préventions du sepsis reste la limitation du risque d'infection. Cela passe par des règles simples d'hygiène comme un lavage régulier des mains, une attention portée aux aliments, à leur conservation et lors de la préparation des repas, un accès à l'eau potable, des vaccinations à jour ou encore un usage raisonné des antibiotiques. De nombreuses organisations luttent quotidiennement afin de sensibiliser les populations à l'aide de documents simples et didactiques (Annexes 1 et 2). Une journée nationale de sensibilisation a également été créée par la Global Sepsis Alliance : le World Sepsis Day se tient chaque année le 13 septembre depuis 2012 (Global Sepsis Alliance 2020).

1.4. Physiopathogénie

Nous avons vu précédemment les mécanismes de l'immunité innée qui se mettent en place lors de la pénétration d'un agent pathogène dans l'organisme. Dans le cas du sepsis, il existe une dérégulation de la balance entre mécanismes pro et anti-inflammatoires.

Tout commence par la reconnaissance de différents signaux lors de la pénétration dans l'organisme de l'agent infectieux. Les interactions entre les PAMPs ou les DAMPs et les récepteurs spécifiques à la surface des CPAs initient le syndrome clinique *via* la transcription des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, dans le métabolisme cellulaire ou

l'immunité adaptative. Des cytokines pro-inflammatoires sont synthétisées et le système du complément est activé. La fraction du complément C5a et son récepteur jouent un rôle important dans le recrutement des cellules immunitaires par chimiotactisme, l'induction d'un stress oxydatif au sein des neutrophiles ou encore l'amplification de la réponse cytokinique (Jarczak, Kluge, Nierhaus 2021; Nessler et al. 2017).

Parallèlement à cette réponse pro-inflammatoire, on retrouve précocement une réponse anti-inflammatoire compensatrice. Chez de nombreux patients, elle aboutit à une « immunoparalysie » dont les mécanismes sont encore mal compris. On observe une lymphopénie par apoptose, la présence de neutrophiles immatures en lien avec l'augmentation de la granulopoïèse ainsi qu'une production accrue de cytokines anti-inflammatoires. Les macrophages M1 évoluent vers un phénotype M2 qui contribue à la réparation tissulaire. Les CPAs perdent également l'expression du CMHII. Cet état d'immunosuppression peut devenir chronique chez les patients survivants et est associé à une augmentation de la fréquence de pathologies opportunistes et de réactivations virales (Figure 32). Cette association entre une faible activité inflammatoire et une immunosuppression chronique est résumée par le concept nommé *Persistent Inflammation, immunosuppression and Catabolism Syndrome* ou PICS. On décrit également des modifications épigénétiques à l'origine d'une reprogrammation des cellules immunitaires à long terme (Cavaillon, Singer, Skirecki 2020; Singer et al. 2016; Nessler et al. 2017).

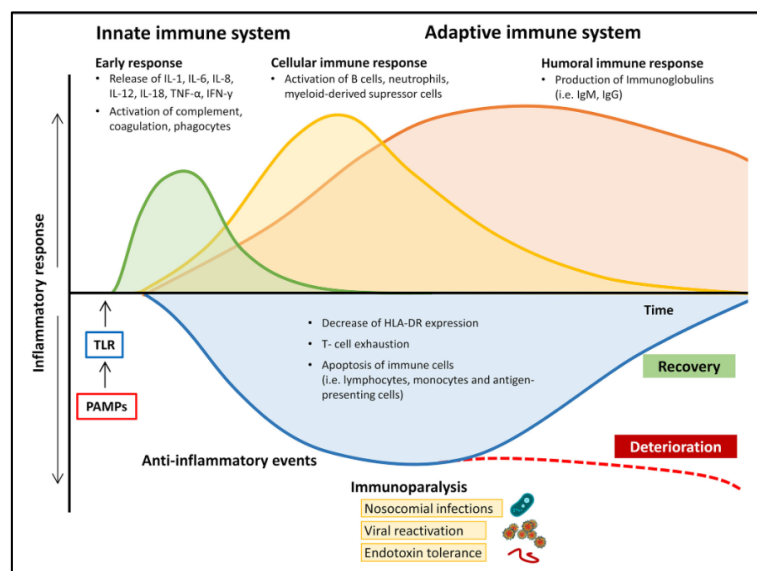


Figure 32 : Variations dans les réponses pro et anti-inflammatoires du système immunitaire au cours de l'évolution du sepsis et du choc septique. HLA-DR, Human Leukocyte antigen-D related ; IgM/G, immunoglobuline M/G ; IL, interleukine ; IFN- γ , interféron γ ; PAMPs, Pathogen-associated molecular patterns ; TNF- α , Tumor necrosis factor α ; TLR, toll-like receptor. Source : (Jarczak, Kluge, Nierhaus 2021)

On observe également une dysfonction au niveau des endothéliums vasculaires. L'intégrité de la barrière endothéliale est compromise sous l'action des cytokines pro-inflammatoires et du stress oxydant. On constate une augmentation de l'adhésion des leucocytes et des plaquettes grâce à l'expression accrue d'intégrines et de sélectines (adhésines). Les phénomènes anti-coagulants sont quant à eux dépassés entraînant une surconsommation puis un épuisement des plaquettes et des facteurs de la coagulation. Une étude de 2019 a montré que dans un groupe de 1895 patients admis pour choc septique, 29 % d'entre eux présentaient une Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (Saito et al. 2019). Cette activation de la coagulation systémique associée à une fibrinolyse limitée dans un contexte de sepsis est appelée *Sepsis Induced Coagulopathy* (SIC). Des amines et peptides vasoactifs sont libérés entraînant une chute de la pression sanguine. L'augmentation de la perméabilité vasculaire induit une fuite de plasma et de leucocytes à l'origine d'un œdème tissulaire (Jarczak, Kluge, Nierhaus 2021; King et al. 2014; Nessler et al. 2017).

L'ensemble de ces phénomènes réduit l'apport tissulaire en oxygène. A l'échelle cellulaire, le stress oxydant entraîne une dysfonction mitochondriale altérant la respiration cellulaire. S'en suit alors une dysfonction multi-organique, caractéristique du sepsis (Figure 33) (Cavaillon, Singer, Skirecki 2020; Nessler et al. 2017).

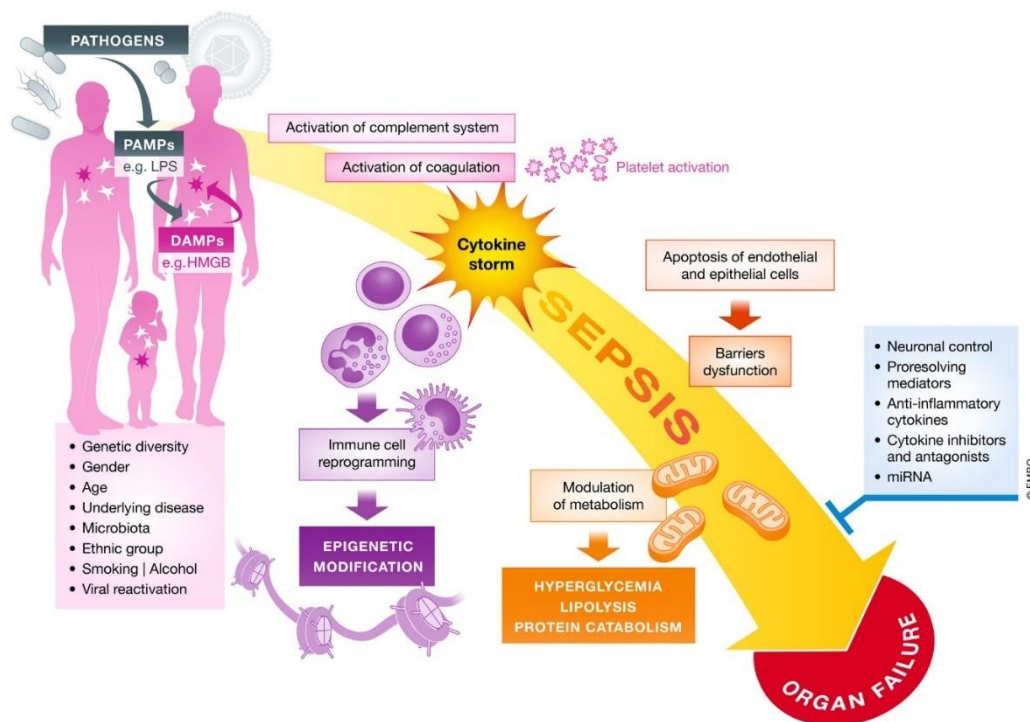


Figure 33 : Physiopathologie du sepsis résumée. PAMP, *pathogen associated molecular pattern* ; LPS, lipopolysaccharide; DAMP, *damage associated molecular pattern*; HMGB, *high mobility groupe box*, protéine inflammatoire. Source : (Cavaillon, Singer, Skirecki 2020)

2. Les objectifs

Nous avons donc pu appréhender la problématique représentée aujourd'hui par le sepsis et la nécessité de concentrer les recherches afin d'améliorer la compréhension de ses mécanismes pour proposer de nouvelles thérapies. Nous avons vu que les phénomènes observés lors du sepsis sont de natures diverses et que l'un des grands axes de sa pathogénie est celui du dérèglement immunitaire.

Bien qu'au cours des trente dernières années, le nombre d'études portant sur le sepsis ait fortement augmenté, celui-ci demeure aujourd'hui un problème de santé publique majeur. L'une des explications pourrait être l'inadéquation des modèles animaux utilisés. La souris est l'animal le plus utilisé pour l'étude du sepsis. Or, la réponse des souris face au sepsis est très différente de celle de l'Homme. Contrairement à celui-ci, la souris en sepsis développe bradypnée et bradycardie plutôt que tachypnée et tachycardie. La souris est plus susceptible de présenter une hypothermie plutôt qu'une hyperthermie. Les rongeurs possèdent une résistance aux endotoxines 10^5 fois supérieure à celle de l'Homme (Fairbairn et al. 2011) et une meilleure résilience après une infection (Cavaillon, Singer, Skirecki 2020). Ces différents éléments prouvent que le modèle murin est peu adapté à l'étude du sepsis.

La sélection des patients dans les différents essais cliniques est également complexe car l'expression du sepsis est polymorphe ! Il est difficile d'éviter l'hétérogénéité individuelle et les comorbidités des patients sont des éléments à prendre en compte dans l'impact du sepsis sur leur organisme (Cavaillon, Singer, Skirecki 2020).

La nécessité de trouver de nouveaux modèles animaux pour les études pré-cliniques apparaît ainsi comme évidente et primordiale. Nous avons présenté les nombreuses similitudes anatomiques, physiologiques et immunologiques existantes entre le porc et l'Homme. Possédant des systèmes respiratoire et immunitaire proches, les porcs et les humains peuvent donc présenter une manifestation du sepsis comparable. Les porcs joueront donc un rôle essentiel dans la découverte puis la validation de stratégies contre le sepsis. Il existe encore relativement peu d'études portant sur la compréhension des mécanismes immunologiques du choc septique utilisant le porc comme modèle. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude expérimentale est de valider les données issues des recherches bibliographiques sur le profil des macrophages chez le porc dans un modèle porcin de choc septique. Dans le cadre du projet « Etude physiopathologique des interactions entre les dysfonctions immunitaires, circulatoires et les défaillances d'organes (poumon, foie) dans un modèle aigu de choc septique chez le porc », effectué par l'équipe de recherche APCES, nous avons pu obtenir des échantillons dans des blocs de paraffine.

Comme évoqué précédemment, le sepsis correspond à une dérégulation entre mécanismes pro et anti-inflammatoires. L'incapacité du système immunitaire à contrôler cette infection pourrait impliquer les monocytes et les macrophages, ceux-ci étant des cellules clés de la réponse immunitaire innée et adaptative. Etudier l'évolution des phénotypes des macrophages lors du choc septique pourrait ainsi contribuer à améliorer la compréhension des mécanismes inflammatoires mis en jeu et celle du concept d'immunoparalysie. Le profil

et les caractéristiques des macrophages tissulaires pulmonaires sont bien connus chez l'Homme et le rongeur, mais peu connus chez le porc. Dans ce cadre, les objectifs de notre étude sont les suivants :

-Confirmer les processus inflammatoires au sein des tissus pulmonaires et hépatiques porcins dans un modèle de choc septique induit par instillation de *Pseudomonas aeruginosa*.

-Identifier les macrophages M1 et M2 dans le tissu pulmonaire porcine et proposer une méthode de marquage simple et facilement reproductible.

-Etablir un protocole simplifié d'utilisation du logiciel de traitement d'images pour analyser des échantillons tissulaires.

Afin d'atteindre ces objectifs, j'ai été amenée à effectuer une semaine de stage à l'unité INSERM 1241 de Rennes ainsi qu'à la plateforme d'histologie H2P2. Ces quelques jours m'ont permis d'être formée au logiciel QuPath utilisé pour le traitement d'images biologiques. J'ai également pu observer les différentes techniques d'immunohistochimie décrites dans le protocole ci-dessous afin d'en comprendre les étapes.

3. Matériel et méthodes

3.1. Ethique

Cette étude a été conduite en accord avec les indications du *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* et a été approuvée par le Comité d'éthique de VetAgroSup (Agrément 164, numéro d'autorisation 1819).

3.2. Calcul de la taille de l'échantillon

Afin de déterminer la taille de l'échantillon, la fonction `power.t.test()` du logiciel R.5.2. (R Foundation For Statistical Computing, Vienne, Autriche) a été utilisée. La taille de l'effet a été fixée à 0.3, la déviation standard observée dans la population à 0.2, les données considérées comme appariées, le niveau de significativité fixé à 0.05 et la puissance statistique désirée à 0.8. Les résultats ont donné un effectif de 6. Compte tenu de la sévérité du modèle et du risque de mortalité, la taille de l'échantillon a été arbitrairement augmentée à 9.

3.3. Animaux

Les animaux utilisés pour cette étude étaient des porcs (*Sus scrofa domesticus*) femelles de race Youna, obtenus au Lycée Agricole de Roanne-Chervé, pesant de 25 à 40 kg, âgés de deux à trois mois. Avant le début de l'étude, les animaux ont été acclimatés durant sept jours dans un box avec l'ensemble du groupe. Ils ont été nourris avec de la nourriture standard et de l'eau était proposée à volonté. Douze heures avant le début de l'étude, la nourriture a été retirée mais l'eau a été laissée à disposition.

Les porcs étaient retirés de l'étude s'ils présentaient des signes de maladie à l'issue de la période d'acclimatation (troubles digestifs ou respiratoires, plaies, abcès, faiblesse, anorexie). Les porcs ont été répartis arbitrairement en deux groupes : le groupe basal (anesthésie puis euthanasie des porcs) et le groupe choc (anesthésie, induction du choc septique puis euthanasie). Il y avait cinq porcs dans le groupe basal et huit porcs dans le groupe choc.

3.4. Equipement et anesthésie

Une prémédication a été réalisée avec un mélange 1 : 1 de tilétamine-zolazépam (Zoletil100, 100 mg/mL, Virbac, Carros, France) 3.0 mg/kg IM et de morphine (Morphine Aguetant, 10 mg/mL, Laboratoire Aguetant, Lyon, France) 0,2mg/kg IM. Un cathéter périphérique de 20G a été mis en place dans la veine auriculaire marginale après sédation. Les porcs du groupe basal étaient euthanasiés après prémédication à l'aide d'une solution euthanasiante (T61, MSD Santé Animale, Beaucauze, France). Pour les porcs du groupe choc, l'induction était réalisée au propofol (Propovet 10 mg/mL, Zoetis, Malakoff, France) 4,0 mg/kg IV titré à effet jusqu'à possibilité d'une intubation orotrachéale. L'entretien a été assuré par du sévoflurane (Sevoflo, Zoetis, Malakoff, France) dans 30% d'oxygène associé à une CRI de morphine (0.1 mg/kg/h).

Une fois anesthésiés et intubés, les cochons ont été placés sous ventilation mécanique contrôlée. Les paramètres choisis initialement étaient: volume courant de 8.0 mL/kg et fréquence respiratoire de 16 mpm. Ces valeurs ont été adaptées au cours de l'étude afin de maintenir un EtCO₂ entre 35 et 45 mmHg (4.5-6 kPa). Des fluides isotoniques (Ringer Lactate, Ceva, Libourne, France) ont été administrés durant toute la durée de l'étude avec un débit initial de 5mL/kg/h.

Les cochons ont ensuite été placés en décubitus dorsal. La veine jugulaire externe gauche a été disséquée afin de mettre en place un cathéter veineux central (Multicath 3 - 7.5Fr, Vygon, Ecoen, France) permettant l'administration de solutés. Un cathéter artériel pulmonaire (Edwards Life science® catheter, Irvine, USA) a été inséré dans la veine jugulaire droite jusqu'à l'artère pulmonaire permettant des mesures de débit cardiaque. L'emplacement approprié du cathéter était déterminé grâce à l'observation des caractéristiques de la courbe de pression. Un cathéter artériel a également été mis en place dans l'artère fémorale droite pour la mesure de la pression artérielle invasive. Un moniteur multiparamétrique a permis de mesurer les paramètres suivants : fréquence cardiaque (FC), pression artérielle moyenne (PAM), pression artérielle systolique (PAS), pression artérielle diastolique (PAD), variation de la pression pulsée (VPP) et pression artérielle pulmonaire systolique (PAPS).

3.5. Protocole expérimental

Après induction de l'anesthésie et équipement chirurgical, chaque cochon a reçu un bolus initial de Ringer Lactate (10mL/kg sur 20 minutes). Suite à l'administration des bolus et après 20 minutes de stabilisation hémodynamique, chaque cochon a reçu une perfusion de bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (5×10^8 colony forming unit CFU/mL perfusé à 0.3 mL/20 kg/min) via le cathéter veineux central. La perfusion était stoppée au moment de l'induction du choc septique, défini par une PAM < 40 mmHg. Après induction du choc, les animaux ont reçu du NaCl 0,9%, 1mL pour 3 kg de poids vif.

Les porcs étaient ensuite réanimés selon le protocole suivant :

- Etape 1 : initier la perfusion de noradrénaline. Commencer à la dose de 0.05 µg/kg/min IV puis augmenter au besoin, jusqu'à 2 µg/kg/min maximum. Cibler une PAM à 60 mmHg.
En cas d'hypotension sévère (PAM < 20 mmHg) associée à une bradycardie (FC < 30 bpm) ou un arrêt cardiaque : administrer de l'adrénaline (0.01 mg/kg IV) et réaliser un massage cardiaque (objectif : 120 bpm).
- Etape 2 : si le débit cardiaque (DC) reste inférieur à 50% de sa valeur basale, initier la perfusion de dobutamine, inotrope positif (dose initiale 2.5 µg/kg/min IV jusqu'à 20 µg/kg/min maximum).

Chaque cochon était considéré comme stable lorsque les objectifs thérapeutiques étaient atteints (PAM = 60 mmHg ; DC > 50% de la valeur basale) et maintenus pendant 20 minutes. Une fois stabilisé, chaque animal a été suivi pendant 2h30. Les dégradations hémodynamiques

étaient prises en charge selon le protocole présenté ci-dessus. Des bolus de fluides étaient réalisés lorsque la VPP était supérieure à 13%. Les paramètres hémodynamiques ont été mesurés tout au long de l'expérience et, à la fin des 2h30, chaque porc a été sacrifié à l'aide d'une solution euthanasiante (T61, MSD Santé Animale, Beaucauze, France). Des échantillons de poumon et foie ont été récupérés et mis dans du formol tamponné pH 7 à 4%.

3.6. Préparation de la souche de *Pseudomonas aeruginosa*

Une souche de *Pseudomonas aeruginosa* de référence (ATCC 27853) a été utilisée pour l'induction du sepsis. Cette souche a été conservée dans un bouillon cœur/cerveille à -80°C. Quarante-huit heures avant l'étude, 2 sous-cultures ont été réalisées afin d'éviter toute variation de la souche. La suspension a été placée au réfrigérateur, prête à l'emploi, moins de 2h avant l'administration aux cochons. Afin de vérifier la concentration de l'inoculum, 2 dilutions de suspension de la bactérie ont été dispersées sur des géloses Mueller Hinton à l'aide d'un plaqueur en spirale (AES/ 274 bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Après une nuit d'incubation à 37°C, la concentration de bactéries a été déterminée à l'aide du nomogramme du système Spiral®.

3.7. Traitement et analyse des échantillons

i. Inclusion des tissus en paraffine

Les échantillons ont été fixés 7 jours dans le formol tamponné pH 7 à 4%, puis dans l'éthanol à 70% pendant 7 à 10 jours, et ont ensuite été mis en cassettes. Ils ont été imprégnés dans l'automate EXCELSIOR ES (Thermo Scientific) au cours d'un programme de 8h. Ce programme a consisté en une déshydratation des échantillons par 6 bains d'alcool progressifs puis 3 bains de Xylène, suivie de l'imprégnation dans 3 bains de paraffine. Des blocs de paraffine ont été réalisés à l'aide de l'automate Histocentre 3 (Shandon).

ii. Confection des coupes

La coupe des blocs de paraffine d'une épaisseur de 4µm a été réalisée avec un microtome Microm HM340. Les coupes ont été recueillies sur des lames de verre Super Frost Plus et mises à sécher à l'étuve 1h à 58°C.

iii. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)

Les coupes de 4µm ont été colorées à l'HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) sur l'automate LEICA ST 5020 selon différentes étapes. Elles ont été déparaffinées dans 3 bains successifs de Xylène puis réhydratées progressivement dans 2 bains d'alcool dégressifs (100-70%). Les coupes ont ensuite été immergées dans l'eau. Les noyaux ont été colorés à l'hématoxyline de Gill 2 durant 2 minutes, le cytoplasme à l'éosine aqueuse durant 2 minutes et le tissu conjonctif au safran alcoolique durant 1 minute. Les coupes ont ensuite été déshydratées avec

2 bains d'alcool progressifs (70-100°) et 2 bains de xylène puis recouvertes d'une lamelle dans la station de collage (Leica ST500).

iv. Protocole d'immunohistochimie (IHC) pour le marquage spécifique des macrophages M1 et M2 chez le porc (Ac anti-CD14, CD68, CD86, CD163 et CD206)

L'immunohistochimie a été réalisée sur l'automate DISCOVERY Ultra (Roche®, Illkirch, France) à partir des coupes de 4µm. Les coupes ont été déparaffinées 8 minutes à 75°C avec l'EZ Prep Roche®. Les sites antigéniques ont été démasqués 8 minutes à 95°C puis 28 minutes à 100°C avec le tampon CC1® (Tris EDTA pH8). Les peroxydases endogènes ont été inhibées avec le Discovery Inhibiteur (Roche) 10 minutes à température ambiante. Les anticorps (Ac) primaires ont ensuite été incubés 60 minutes à 37°C : Ac anti-CD206 (1/100), Ac anti-CD163 (1/100) et Ac anti-CD14 (1/2000) (Tableau VI). Les coupes ont ensuite été lavées dans du tampon Tris pH 7,4. L'anticorps secondaire Goat anti-Rabbit couplé à l'HRP (Roche) a ensuite été incubé 16 minutes à 37°C. L'ensemble a été révélé avec la diaminobenzidine (OmniMap DAB® Roche) durant 8 minutes. Enfin, une contre-coloration a été réalisée à l'hématoxyline de Mayer. Les échantillons ont enfin été déshydratés et montés entre lame et lamelle. Puis les lames ont été numérisées à l'aide du Hamamatsu Nanozoomer 2.0 RS.

Anticorps	Fournisseur	Réf	Clone	Espèce	Dilution	Espèces réactives
CD206(429)	Abcam	Ab64693	poly	Lapin	1/2000	Humain, souris, rat
CD163(544)	Abcam	Ab182422	EPR19518	Lapin	1/100	Humain, souris, rat
CD14(1351)	BIORAD	MCA1218GA	MIL2	Souris	1/100	Porc, humain
CD68(272 & 1006)	Abdmax	500-6074	KP1	Souris	1/50	Humain, souris, rat.
	NeoBiotechnologies	968-MSM1-PO	KP1	Souris	1/50	Humain, souris, rat, lapin, chat.
CD86(563)	Invitrogen	AB_11153536	BU63	Souris	1/50	Humain

Tableau VI : Anticorps utilisés pour l'identification des macrophages chez le porc par immunohistochimie.

Source : Eloïse BESSON

v. Protocole Multiplex pour le co-marquage CD14/CD163

L'immunohistochimie technique Multiplex a été réalisée sur l'automate DISCOVERY Ultra (Roche®, Illkirch, France) à partir des coupes de 4µm. Un déparaffinage des coupes a été réalisé avec l'EZ Prep Roche® 8 minutes à 75°C. Les sites antigéniques ont été démasqués 8 minutes à 95°C puis 28 minutes à 100°C avec le tampon CC1® (Tris EDTA Ph8). Les peroxydases endogènes ont été inhibées avec le Discovery Inhibiteur (Roche) 10 minutes à température

ambiante. Le premier anticorps primaire anti-CD14 (1/100) a été mis en incubation 60 minutes à 37°C. Un lavage dans du tampon Tris pH 7,4 a été ensuite réalisé. L'anticorps secondaire Goat anti-Rabbit couplé à l'HRP (Roche) a été incubé 16 minutes à 37°C. L'ensemble a été révélé avec le kit à la rhodamine (Roche) 8 minutes.

Ensuite, l'échantillon a été dénaturé avec la solution Ventana citrate pH 6 pendant 8 minutes à 100°C puis neutralisé avec le Discovery inhibiteur 8 minutes à 37°C. L'incubation du deuxième anticorps primaire anti-CD163 (1/100) a été réalisée 60 minutes à 37°C. Un lavage a été effectué dans du tampon Tris pH 7,4. L'anticorps secondaire Goat anti-Rabbit couplé à l'HRP (Roche) a ensuite été incubé 16 minutes à 37°C. La révélation a été réalisée avec le kit Cyanine 5 (Roche) 8 minutes. Une contre coloration des noyaux a été effectuée au DAPI puis les échantillons ont été montés entre lame et lamelle. Les lames ont enfin été numérisées à l'aide du Hamamatsu Nanozoomer 2.0 RS.

La méthode Multiplex permet de travailler avec un large panel d'anticorps primaires et secondaires sans réaction croisée et est donc utilisée pour la réalisation de co-marquages. Chaque mono-marquage est réalisé indépendamment des autres. Les marquages sont réalisés en série et entre chaque marquage, les anticorps utilisés sont décrochés (dénaturation et neutralisation = chaleur + citrate pH 6 + H₂O₂) tout en préservant le marquage. Cette technique utilise un anticorps primaire non marqué, lui-même reconnu par un anticorps secondaire (HRP). C'est le substrat utilisé qui rend cette technique singulière car le substrat de l'enzyme HRP n'est pas transformé en colorant comme en IHC chromogénique (Figure 34). Cette technique permet de réaliser jusqu'à 5 marquages différents.

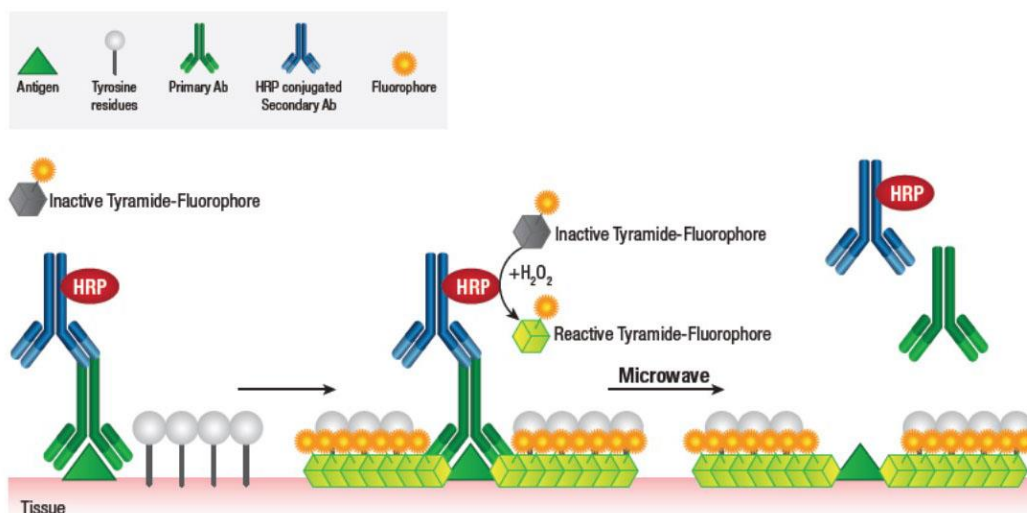


Figure 34 : Principe et mécanismes du protocole de marquage Multiplex. Un anticorps primaire non marqué est utilisé et est reconnu par un anticorps secondaire HRP. L'HRP va catalyser le dépôt de molécules de tyramides conjuguées à un fluorophore. Puis, les tyramides activées se fixent de manière covalente aux résidus tyrosine de l'antigène/cible ou des protéines proches. Nous pouvons ainsi décrocher les anticorps en préservant la fluorescence associée à l'antigène. Source : (Cell Signaling Technology 2023).

3.8. Traitement des images

Les lames ont été lues et analysées à l'aide du logiciel QuPath 0.4.3 (Bankhead et al. 2017). La détection cellulaire a été réalisée avec la méthode Stardist basée sur le Deep Learning et utilisée pour la détection 2D et 3D des noyaux (Schmidt et al. 2018). Un modèle de script pour la segmentation nucléaire a été utilisé (Pécot, Alekseyenko, Wallace 2022) (Greenwald et al. 2022). Le protocole détaillé d'analyses des lames est disponible en annexe (Annexe 3).

3.9. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9.5.1 pour Windows, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA. Le test de normalité Shapiro-Wilk a été utilisé suivi du test T de Student pour les valeurs ayant passé le test de normalité. Dans le cas contraire, le test non statistique non paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney a été employé. Une valeur de P de 0,05 a été considérée comme le niveau de significativité.

4. Résultats

4.1. Analyses histologiques

i. Lésions de l'arbre respiratoire associées au choc septique chez le porc

Afin d'évaluer les différentes lésions pulmonaires à la suite du choc septique chez le porc et de déterminer si une réponse inflammatoire a été induite, une analyse histologique pulmonaire a été réalisée en collaboration avec Dr Orlando Musso, anatomopathologiste à l'unité INSERM 1241 de l'Université de Rennes. Les analyses des coupes histologiques colorées au HES ont révélé une structure pulmonaire normale dans le groupe basal : aucune modification du parenchyme pulmonaire n'a été observée (Figure 35A). En revanche, pour les poumons des porcs soumis au choc septique, nous avons observé que la densité cellulaire des parois alvéolaires est beaucoup plus importante que celle retrouvée chez les porcs du groupe basal (Figure 35B).

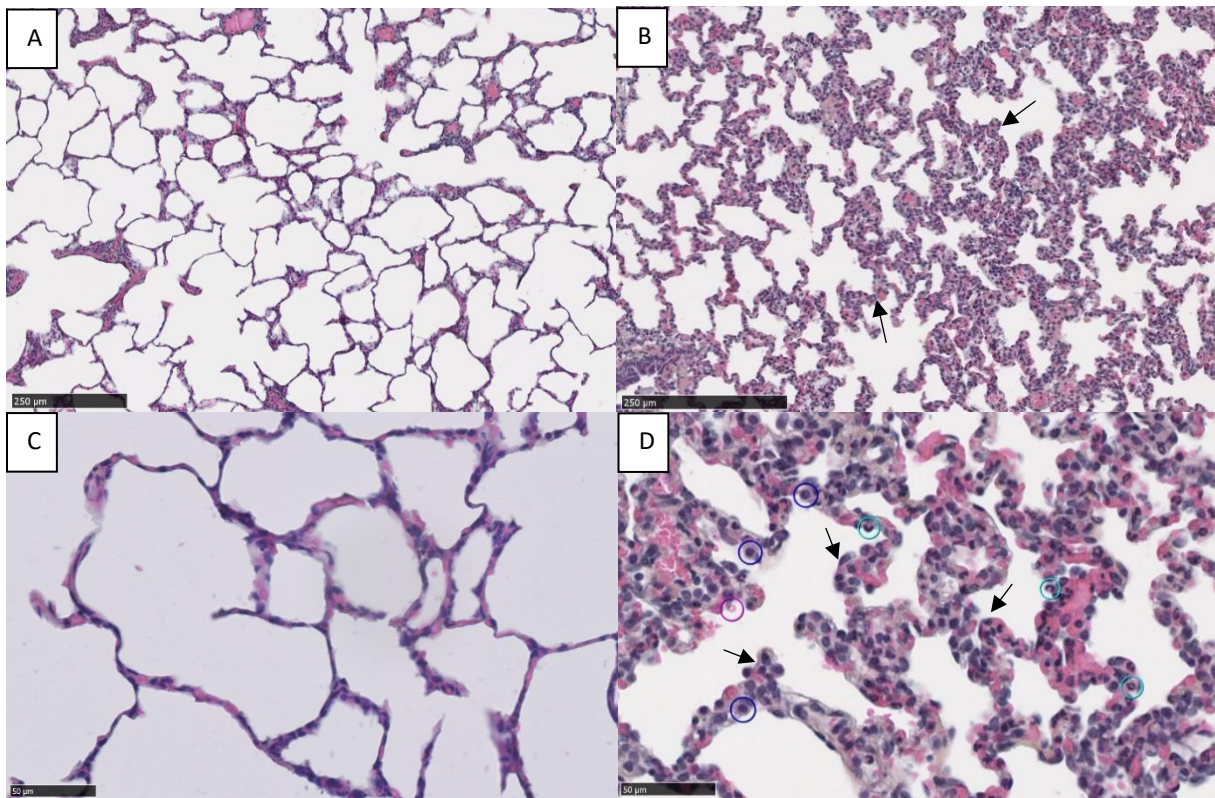


Figure 35 : Parenchyme pulmonaire de porc coloré au HES. (A et C) Les tissus présentés proviennent de porcs dans le groupe contrôle ; (B et D) Porcs 2h30min après instillation de *Pseudomonas aeruginosa*. (B) Les flèches indiquent l'augmentation de densité cellulaire des parois alvéolaires. Barre d'échelle : 150 μ m, NDP.view, Objectif x10 ; (D) Les flèches indiquent des parois alvéolaires pulmonaires épaissies par un infiltrat inflammatoire majoritairement mononucléé. On observe des macrophages (cercles bleu foncé), des hématies (cercles roses) et des neutrophiles (cercles bleu clair). Barre d'échelle : 50 μ m. NDP.view, Objectif x40. Source : Eloïse Besson

L'analyse des lames des poumons des porcs soumis à un choc septique révèle également la présence de parois alvéolaires à forte densité, épaissies par un infiltrat inflammatoire majoritairement mononucléé, qui s'avère absent chez le porc basal (Figure 36C et D). De plus, une congestion importante est présente, des zones de stase vasculaire sont observables chez le porc soumis au choc septique. Les vaisseaux sont dilatés et remplis d'hématies (Figure 36A et 36B) comparés à ceux observés chez les poumons du groupe basal. Des zones d'œdèmes intra-alvéolaires sont également visibles sur la Figure 36D.

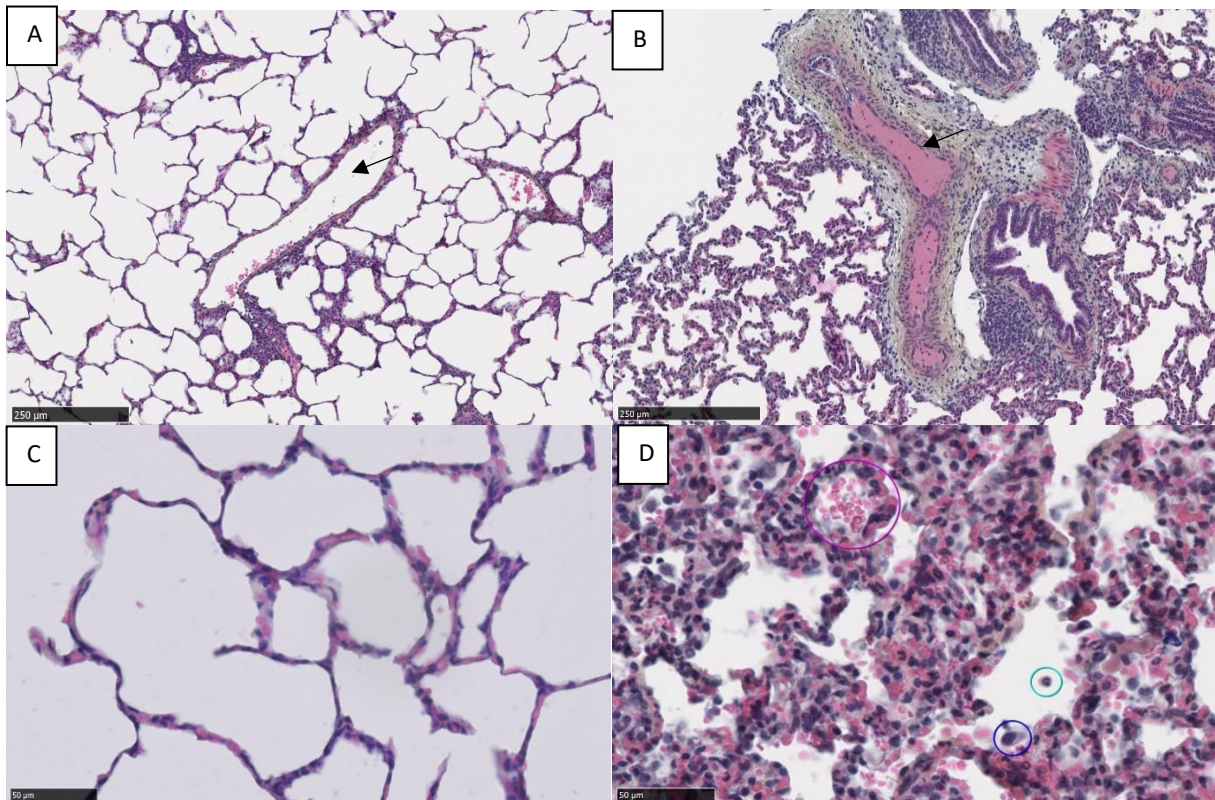


Figure 36 : Parenchyme pulmonaire de porc coloré au HES. (A et C) Les tissus présentés proviennent de porcs contrôles ; (B et D) Porcs en choc septique, 2h30 après instillation de *Pseudomonas aeruginosa*. Les flèches indiquent (A) un vaisseau pulmonaire ; (B) une zone de stase vasculaire. Barre d'échelle : 250µm NDP.view, Objectif x8,5 (D) Les cercles indiquent des zones d'œdèmes intra-alvéolaires avec présence d'hématies (cercle rose) et de cellules immunitaires (polynucléaire neutrophile en bleu clair, macrophage en bleu foncé). Barre d'échelle : 50µm. NDP.view, Objectif x40. Source : Eloïse Besson

ii. Lésions hépatiques associées au choc septique chez le porc

Comme pour les poumons, nous avons voulu étudier les différentes lésions hépatiques observées à la suite du choc septique et déterminer si une réponse inflammatoire a été induite au niveau du foie. Les coupes histologiques colorées HES ont révélé une structure hépatique

normale dans le groupe basal : aucune modification du parenchyme hépatique n'a été observée (Figure 37).

A l'inverse, nous avons pu observer chez les porcs soumis au choc septique une forte congestion sinusoidale et la présence d'un infiltrat inflammatoire au niveau des septa entre les lobules et des espaces portes (Figure 37A et 37B). On retrouve au sein du parenchyme hépatique des porcs choc des zones d'activation des cellules de Kuppfer, macrophages résidents. On observe également une augmentation du nombre de neutrophiles dans les espaces sinusoidaux chez les porcs choc par rapport aux porcs basal (Figure 37C et 37D).

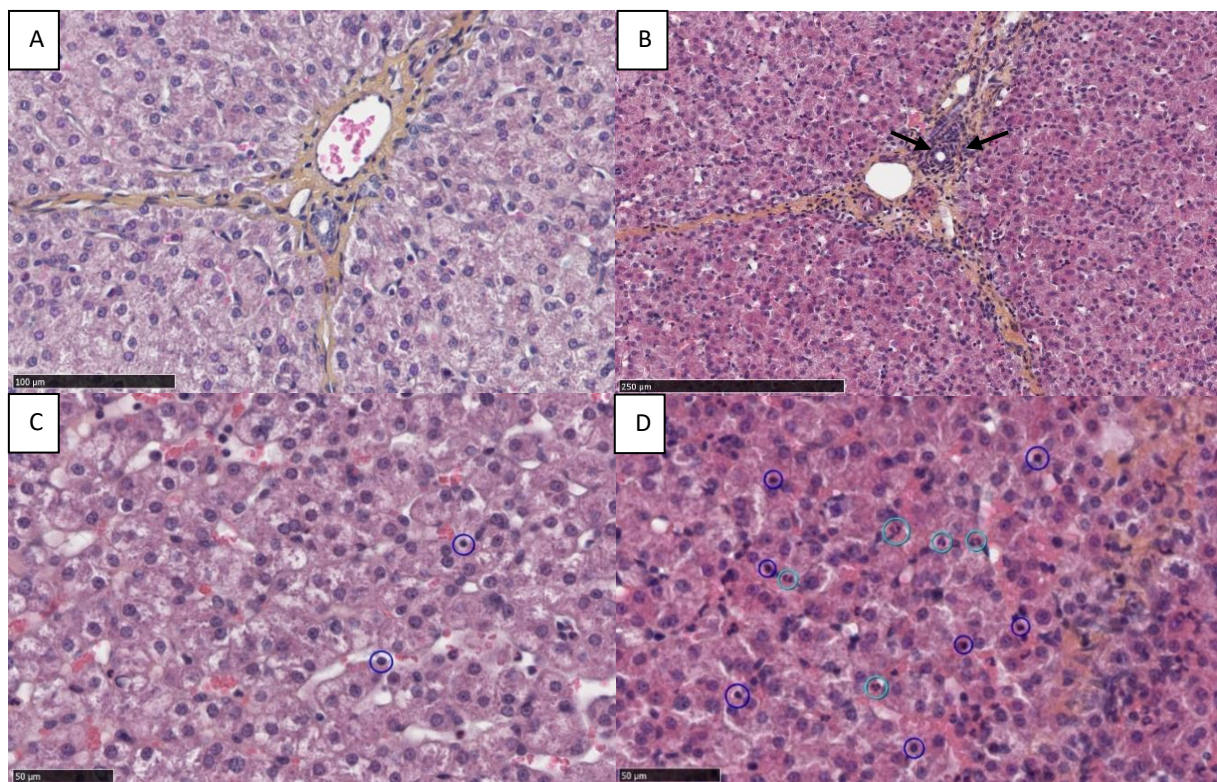


Figure 37 : Parenchyme hépatique de porc coloré au HES. (A et C) Les tissus présentés proviennent de porcs dans le groupe contrôle ; (B et D) Porcs 2h30 après instillation de *Pseudomonas aeruginosa*. (B) Les flèches indiquent la présence d'un infiltrat inflammatoire au niveau des septa et une forte congestion sinusoidale. Barre d'échelle : 250μm. NDP.view, Objectif x20. (C) et (D) Les cercles indiquent la présence de cellules de Kuppfer (cercles bleu foncé) et de neutrophiles (cercles bleu clair) en quantité plus importante chez le porc choc (D) que chez le porc Basal (C). Barre d'échelle : 50μm. NDP.view, Objectif x40. Source : Eloïse Besson

Les échantillons de foie et de poumons des porcs du groupe choc présentent donc tous des motifs inflammatoires avec congestion, œdème et infiltration des tissus par des cellules inflammatoires mononuclées et polynuclées. Ces observations confirment une inflammation tissulaire après induction d'un choc septique chez des porcs à l'aide du protocole présenté. Par la suite, nous avons testé différents marqueurs spécifiques des macrophages M1 et M2 chez le porc.

4.2. Immunohistochimie

Afin d'étudier le profil des macrophages au sein des échantillons de tissus pulmonaires, différents marqueurs ont été choisis pour être testés en se basant sur ceux décrits dans la littérature comme marqueurs des macrophages M1 et M2 chez l'Homme.

- i. Marquage des macrophages tissulaires et des macrophages de type M1 : utilisation des anticorps anti-CD68 et anti-CD86

Les marqueurs CD68 et CD86 ont été décrits dans la littérature comme marqueurs, respectivement, des macrophages tissulaires et des macrophages M1 chez l'homme (voir partie II.8.v.). Nous avons utilisé deux anticorps anti-CD68 et anti-CD86 afin de déterminer si ces 2 marqueurs sont également valables chez le porc.

L'utilisation de l'anticorps anti-CD86 n'a pas permis de réaliser un marquage cellulaire satisfaisant. Deux dilutions ont été testées (au 50^e et au 250^e) mais les résultats ne sont pas concluants. On observe un marquage diffus non spécifique des tissus pour la dilution au 50^e. Pour la dilution au 250^e, le marquage est presque non visualisable (Figure 38). Cet anticorps anti-CD86 n'est donc pas utilisable sur les tissus pulmonaires chez le porc pour le marquage des macrophages M1.

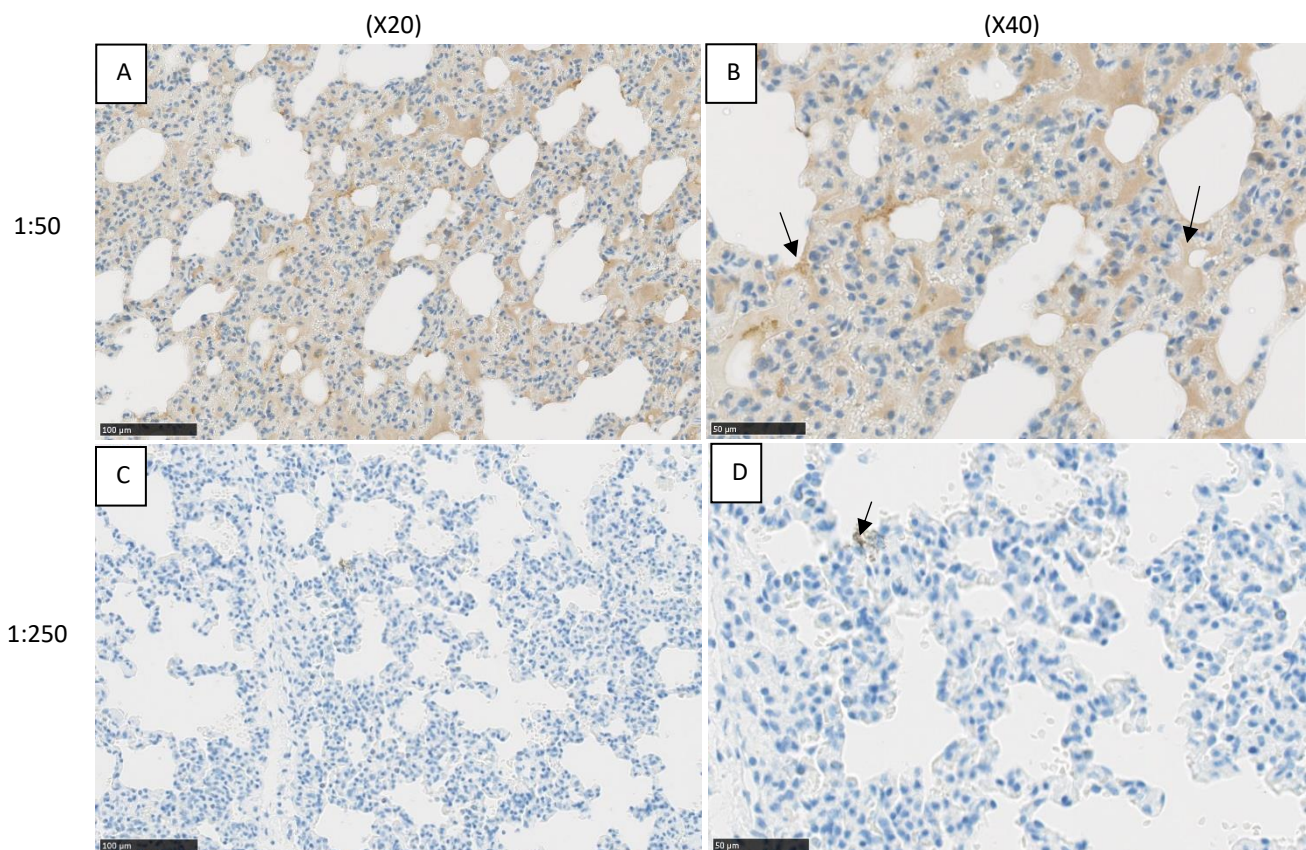


Figure 38 : Parenchyme pulmonaire de porc coloré au HES et marqué à l'anticorps anti-CD86 dilué au (A et B) 1:50 ; (C et D) 1:250. Les flèches noires indiquent des zones de marquage non spécifique par l'anticorps anti-CD86. Barre d'échelle : 100 et 50 µm. NDP.view, Objectifs x20 et x40. Source : Eloïse Besson

Concernant l'utilisation de l'anticorps anti-CD68, les résultats ont également été peu concluants sur les échantillons porcins. Deux anticorps anti-CD68 (a et b) ont été testés sur des échantillons de tissus pulmonaires porcins. L'utilisation de l'anticorps b (Figure 39 C et D) permet une intensité de coloration plus importante que celle obtenue avec l'anticorps a (Figure 39 A et B) pour une même dilution mais le marquage reste peu spécifique pour les deux anticorps. En revanche, le marquage sur les tissus pulmonaires humains avec l'anticorps b est plus sensible et spécifique que celui observé sur les tissus porcins (Figure 39 E et F).

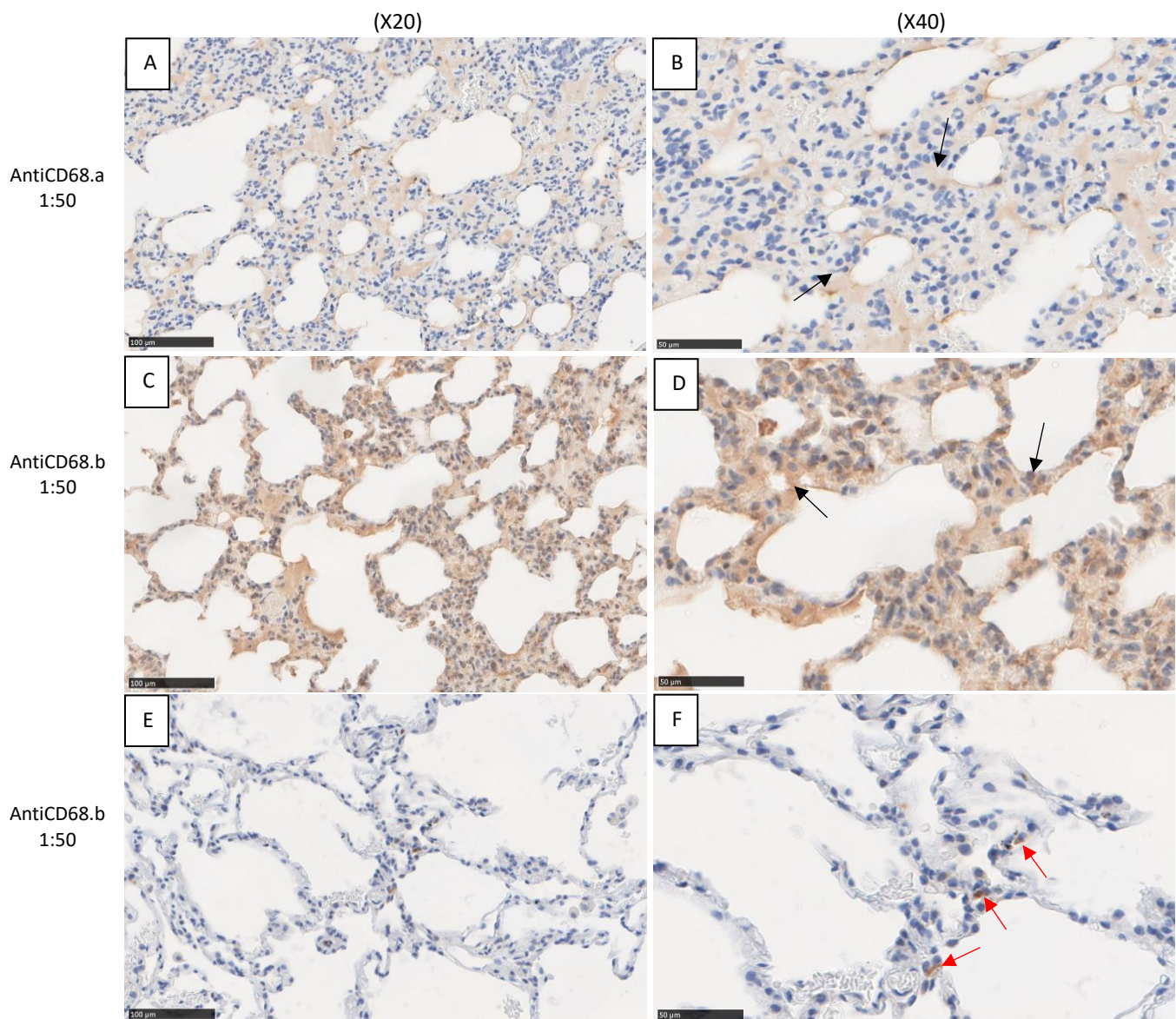


Figure 39 : Parenchyme pulmonaire (A, B, C et D) de porc ; (E et F) d'humain coloré au HES et marqué à l'anticorps anti-CD86 (2 anticorps a et b ont été testés) dilué au 1:50. Les flèches noires indiquent des zones de marquage non spécifique par l'anticorps anti-CD86 et les flèches rouges des cellules marquées spécifiquement par l'anticorps anti-CD68.b. Barre d'échelle : 100 et 50 µm. NDP.view, Objectifs x20 et x40. Source : Eloïse Besson

Les marqueurs CD86 et CD68 n'apparaissent donc pas ici comme des marqueurs appropriés pour les macrophages tissulaires et les macrophages M1 porcins. Nous avons recherché

d'autres marqueurs possibles pour les macrophages M1. Chamorro et al. ont montré que les monocytes porcins CD14⁺CD163⁺ produisaient des quantités élevées de TNF après une stimulation par un LPS, témoignant d'une activité pro-inflammatoire. Nous avons donc réalisé un co-marquage CD14⁺CD163⁺ en considérant les cellules marquées comme étant des macrophages pro-inflammatoires M1 issus des monocytes (Singleton et al. 2016; Chamorro et al. 2005).

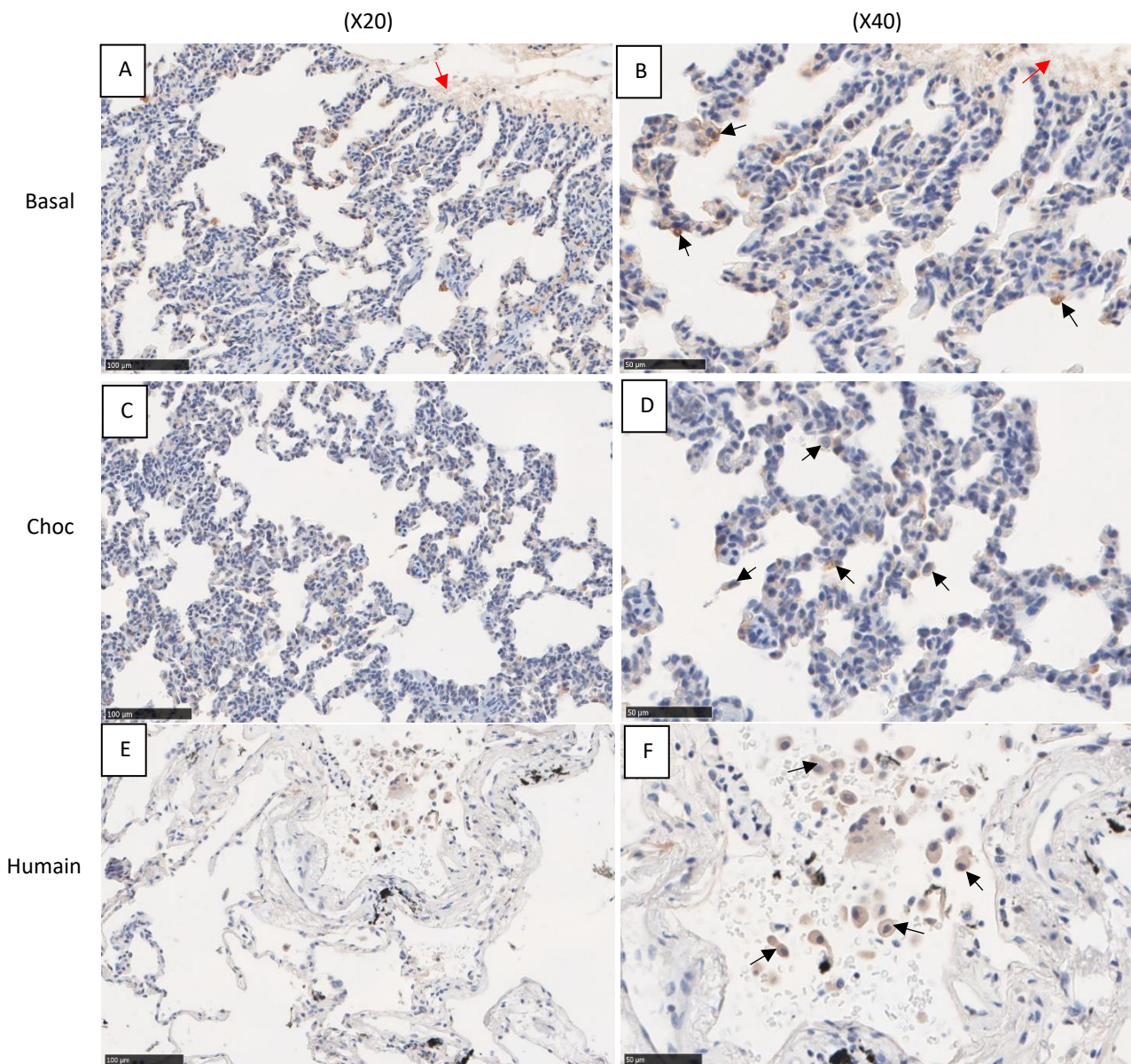


Figure 40 : Parenchyme pulmonaire (A, B, C et D) de porc et (E et F) d'humain marqué à l'anticorps anti-CD14
 Les tissus présentés proviennent de porcs dans le groupe contrôle (A et B); porcs 2h30 après l'instillation (C et D); humain (E et F). Les flèches noires indiquent les cellules marquées en marron par l'anticorps anti-CD14 et les flèches rouges indiquent des zones de marquage moins spécifique qualifié de bruit de fond. Barre d'échelle : 100 et 50 µm. NDP.view, Objectifs x20 et x40. Source : Eloïse Besson

Pour cela, nous avons tout d'abord testé le marqueur CD14. Ce marqueur est présent dans la majorité des tissus et exprimé en grande quantité par les monocytes, les macrophages tissulaires et dans une moindre mesure les granulocytes (Fairbairn et al. 2011).

L'utilisation de l'anticorps anti-CD14 sur les échantillons pulmonaires porcins permet un marquage cellulaire assez sensible mais peu spécifique : de nombreuses zones sont marquées mais on retrouve du bruit de fond en quantité plus ou moins importante selon les échantillons et les zones (Figure 40). En revanche, on observe que chez l'homme cet anticorps est bien spécifique pour des monocytes présents dans l'espace alvéolaire (Figure 40 E et F).

Nous avons ensuite étudié le marqueur CD163 et utilisé un anticorps anti-CD163. L'utilisation de l'anticorps anti-CD163 sur les échantillons pulmonaires porcins permet de réaliser un marquage cellulaire de qualité satisfaisante et assez sensible. Les cellules marquées sont bien délimitées et on observe peu de bruit de fond (Figure 41). L'utilisation d'échantillons pulmonaires humains permet de confirmer la pertinence de ce marqueur chez l'Homme.

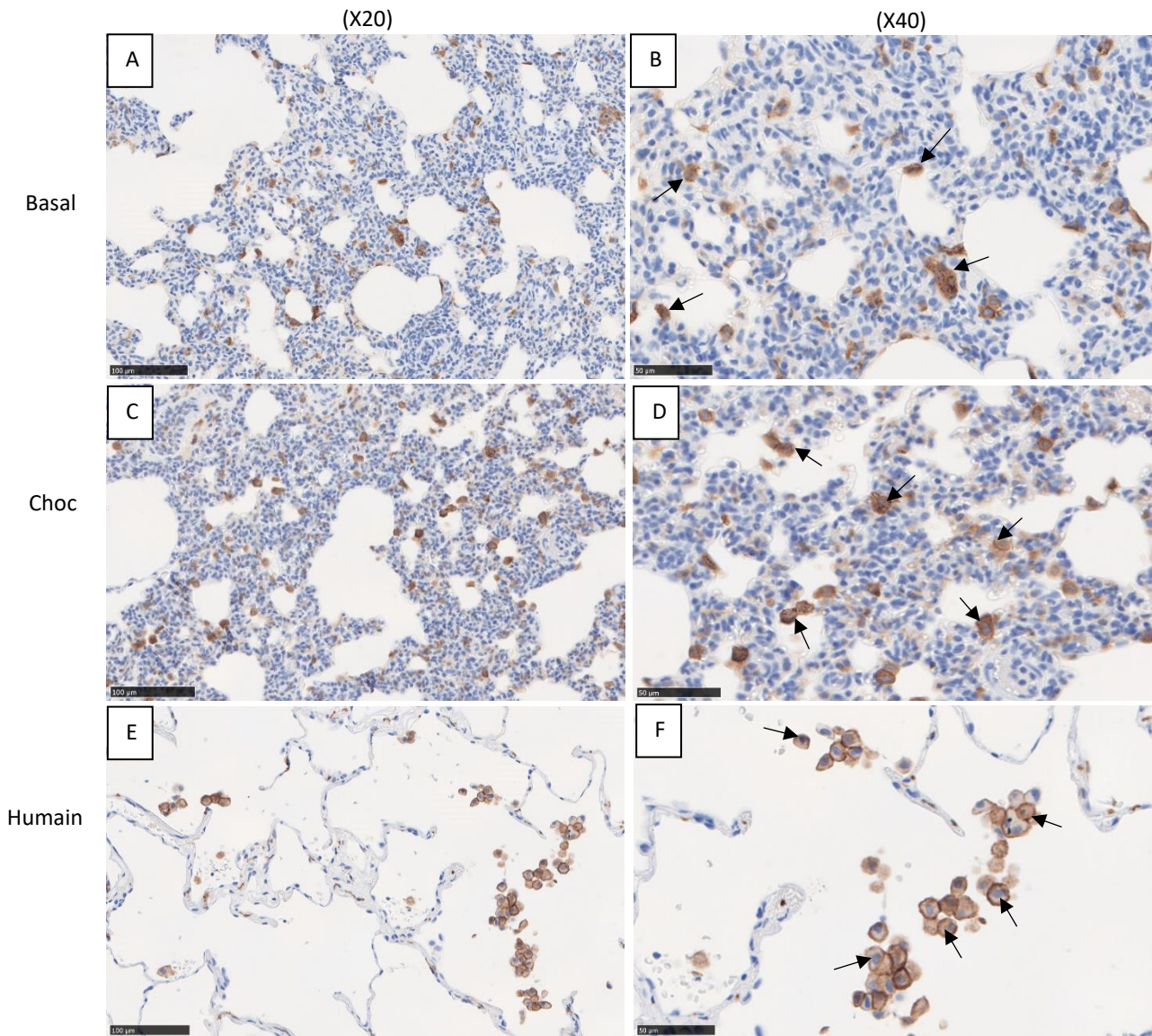


Figure 41 : Parenchyme pulmonaire (A,B,C et D) de porc et (E,F) d'humain coloré au HES et marqué à l'anticorps anti-CD163. Les tissus présentés proviennent de (A et B) porcs dans le groupe contrôle ; (C et D) porcs 2h30 après l'instillation ; (E et F) d'humain. Les flèches indiquent les cellules marquées en marron par l'anticorps anti-CD163. Barre d'échelle : 100 et 50 µm. NDP.view, Objectifs x20 et x40. Source : Eloïse Besson

ii. Quantification des macrophages M1

Une fois les marqueurs spécifiques des macrophages M1 identifiés chez le porc, nous avons recherché une méthode de quantification du marquage cellulaire qui soit facilement reproductible. Nous avons déterminé le nombre de cellules marquées positivement (en marron), c'est-à-dire d'intensité de couleur supérieure à un seuil défini préalablement, sur trois échantillons de chaque groupe. Nous avons quantifié les cellules CD14⁺ chez les porcs basal et choc à l'aide du logiciel QuPath. Le protocole détaillé est disponible en annexe (Annexe 3). On observe une augmentation du nombre de cellules marquées CD14 entre les

porcs du groupe basal et les porcs du groupe choc mais cette différence n'est pas statistiquement significative (Figure 42).

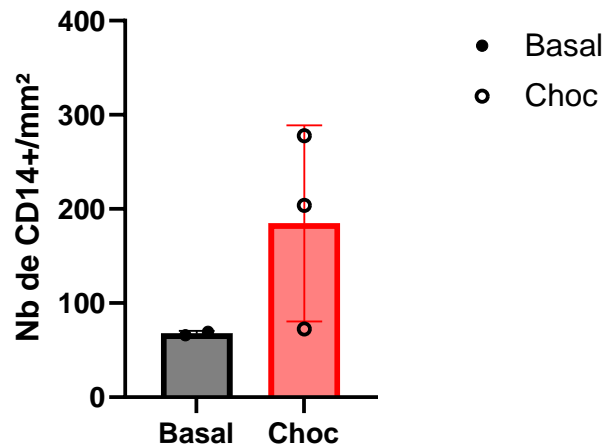


Figure 42 : Nombre de cellules marquées CD14⁺ par mm² sur les échantillons de tissus pulmonaires de porcs du groupe contrôle (basal) et soumis à un choc septique (choc). Les résultats représentent la moyenne ± SEM de 3 porcs basal et 3 porcs soumis au choc septique. Test statistique t-test. * $p < 0,05$. Source : Eloïse Besson

Concernant la quantification des macrophages CD163⁺, on observe une augmentation significative du nombre de cellules marquées CD163 par mm² entre les porcs du groupe basal et les porcs du groupe choc (Figure 43).

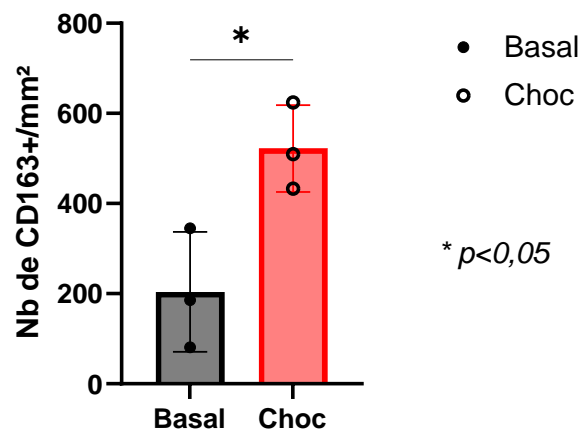


Figure 43 : Nombre de cellules marquées CD163⁺ par mm² sur les échantillons de tissus pulmonaires de porcs du groupe contrôle (basal) et soumis à un choc septique (choc). Les résultats représentent la moyenne ± SEM de 3 porcs basal et 3 porcs soumis au choc septique. Test statistique t-test. * $p < 0,05$. Source : Eloïse Besson

Enfin, nous avons réalisé le co-marquage CD14 et CD163 révélé par immunofluorescence. Les échantillons ont été marqués successivement par les deux anticorps (Figure 44). Le co-marquage réalisé est de qualité satisfaisante.

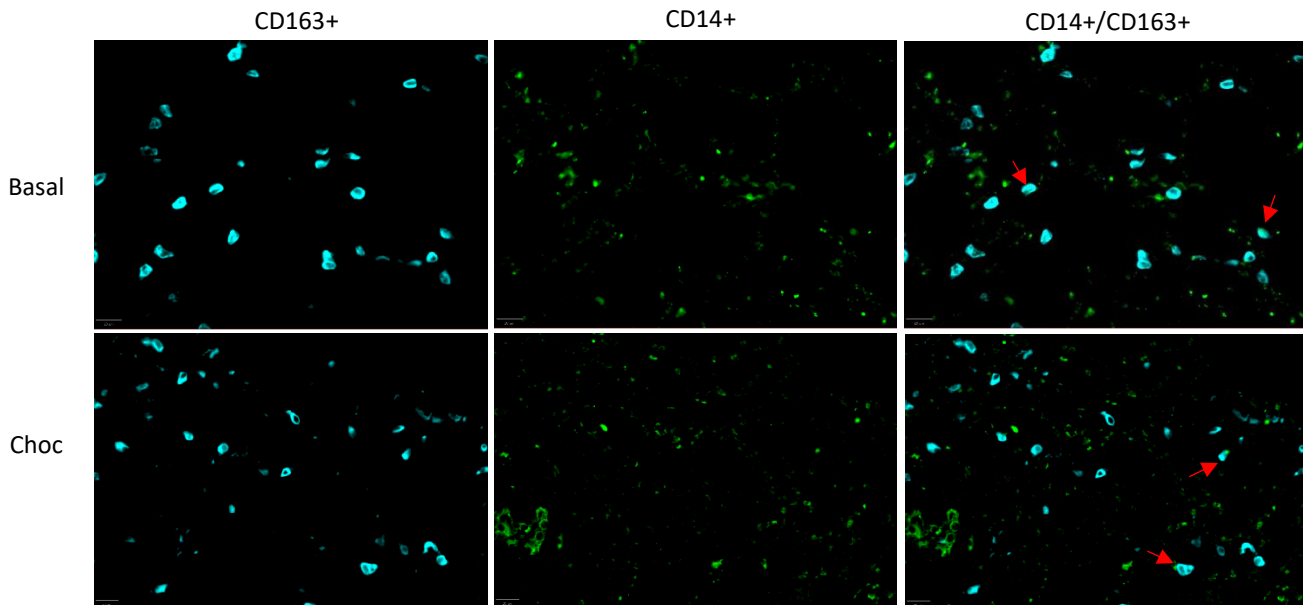


Figure 44 : Parenchyme pulmonaire de porc co-marqué par les anticorps anti-CD14 et anti-CD163 par le protocole Multiplex. Les tissus présentés proviennent de (A) porcs dans le groupe contrôle ; (B) porcs 2h30 après l'instillation. Les flèches indiquent les cellules doublement marquées CD14⁺CD163⁺. Barre d'échelle : 100µm. Source : Eloïse Besson. Images obtenues sur le logiciel QuPath

La reconnaissance des cellules marquées a été réalisée à l'aide d'un « Object Classifier » sur le logiciel QuPath (Figure 45). Cela a permis de discriminer les cellules CD14⁺, CD163⁺, CD14⁺CD163⁺ et colorées uniquement le DAPI. Le protocole complet d'analyse des images est disponible en annexe (Annexe 3).

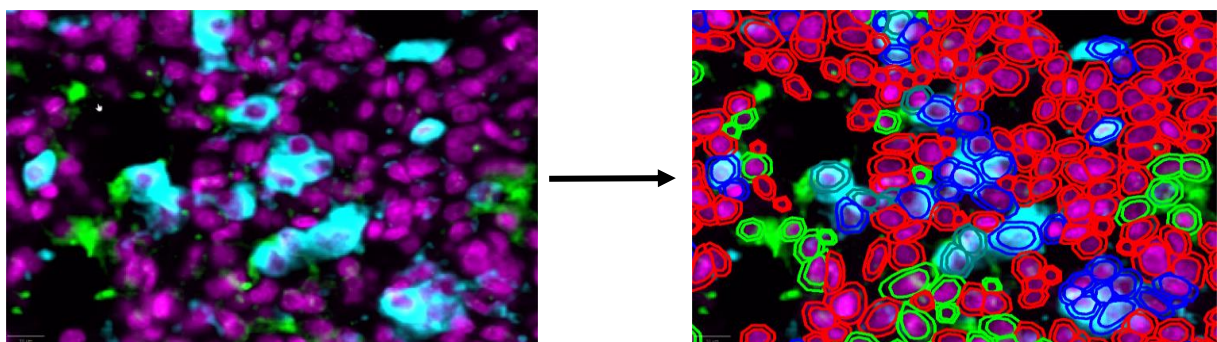


Figure 45 : Principe de détection cellulaire et de reconnaissance des marqueurs cellulaires. Les cellules ont préalablement été détectées. En vert clair, on retrouve les cellules CD14⁺, en bleu foncé CD163⁺, en vert foncé CD14⁺CD163⁺. Les cellules détectées en rouge sont uniquement colorées au DAPI. Source : Eloïse Besson. Images obtenues sur le logiciel QuPath.

Nous avons alors pu comparer le nombre de cellules co-marquées CD14⁺CD163⁺ sur les échantillons de porc basal et choc. On observe une diminution non significative du nombre de cellules CD14⁺CD163⁺ entre les porcs du groupe basal et du groupe choc (Figure 46).

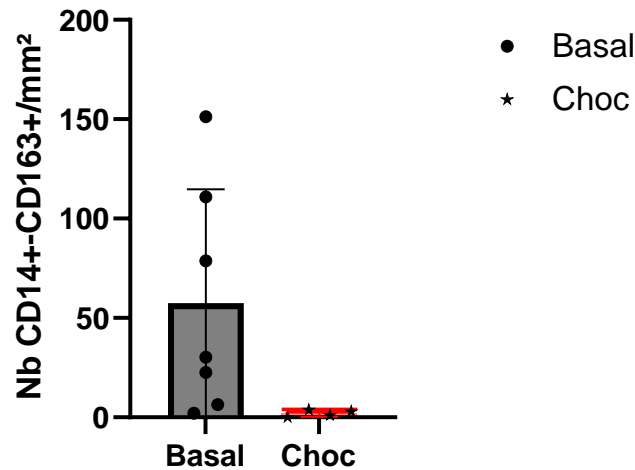


Figure 46 : Nombre de cellules co-marquées CD14⁺CD163⁺ par mm² sur les échantillons de tissus pulmonaires de porcs du groupe contrôle (basal) et soumis à un choc septique (choc). Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de 3 porcs basal et 3 porcs soumis au choc septique. Test statistique t-test. * $p < 0,05$. Source : Eloïse Besson.

iii. Marquage des macrophages M2 : utilisation d'anticorps anti-CD206

Nous avons enfin voulu étudier un marqueur de macrophages M2. Nous avons choisi de tester le marqueur CD206 largement décrit dans la littérature (Genin et al. 2015; Boutillier, Elsawa 2021).

L'utilisation de l'anticorps anti-CD206 sur les échantillons pulmonaires porcins permet de réaliser un marquage cellulaire de qualité satisfaisante et assez sensible. Les cellules marquées sont bien délimitées et d'une intensité de couleur satisfaisante permettant une visualisation rapide des éléments marqués. On observe peu de zone de bruit de fond. Nous avons également pu tester l'anticorps anti-CD206 sur un échantillon de poumon humain (Figure 47). Les résultats confirment que le marqueur CD206 est un marqueur sensible des macrophages M2 chez l'humain et chez le porc.

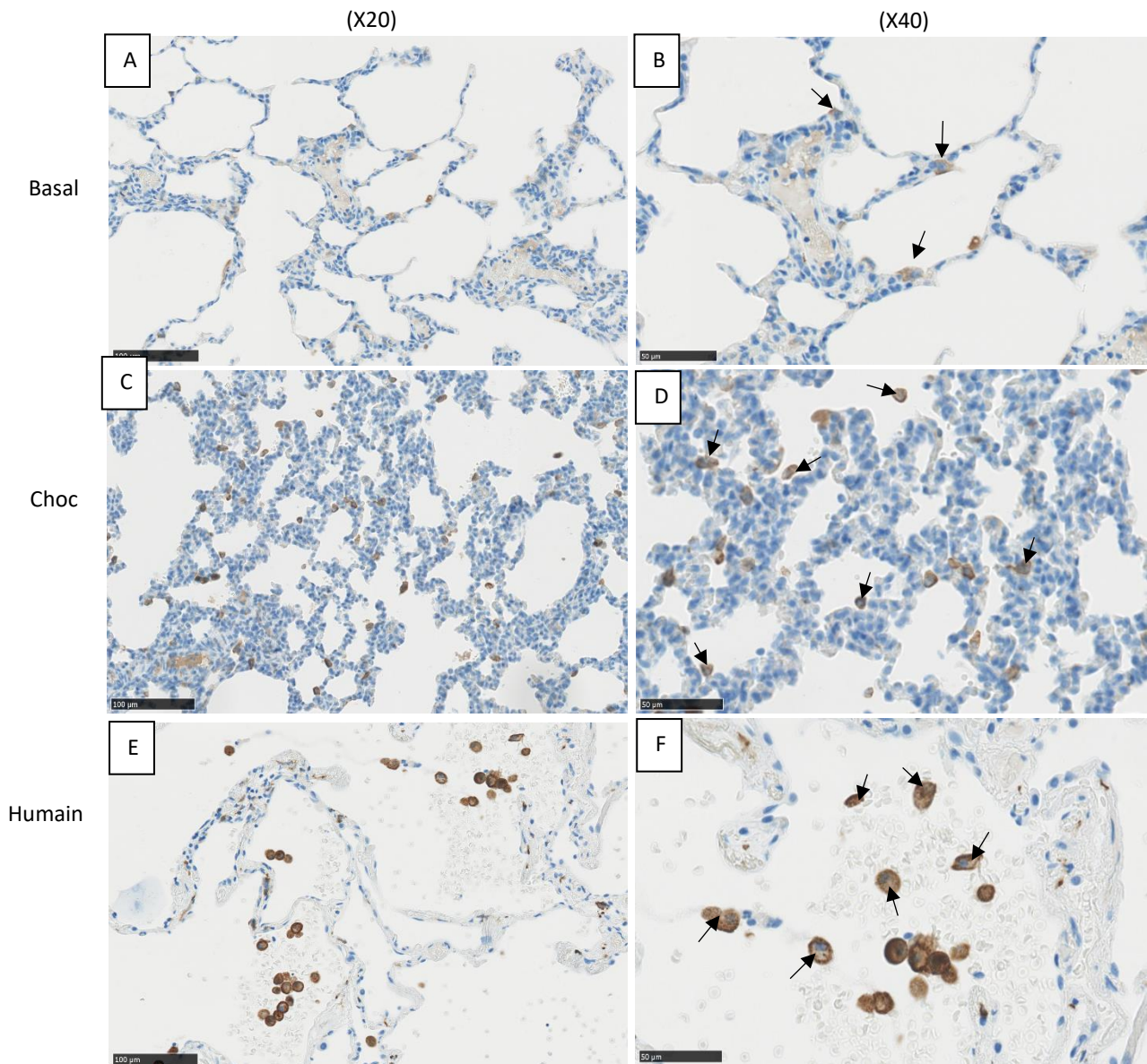


Figure 47 : Parenchyme pulmonaire (A, B, C et D) de porc et (E, F) d'humain coloré au HES et marqué à l'anticorps anti-CD206. Les tissus présentés proviennent de (A et B) porcs dans le groupe contrôle ; (C et D) porcs 2h30 après l'instillation ; (E et F) d'humain. Les flèches indiquent les cellules marquées en marron par l'anticorps anti-CD206. Barre d'échelle : 100 et 50 µm. NDP.view, Objectifs x20 et x40. Source : Eloïse Besson

iv. Quantification des macrophages M2

Un fois un marqueur spécifique des macrophages M2 chez le porc également identifié, la même méthode de quantification du marquage cellulaire a été utilisée avec le logiciel QuPath.

Nous pouvons observer une augmentation du nombre de cellules marquées CD206 chez les porcs du groupe choc par rapport aux porcs du groupe basal mais cette différence n'est pas statistiquement significative (Figure 48).

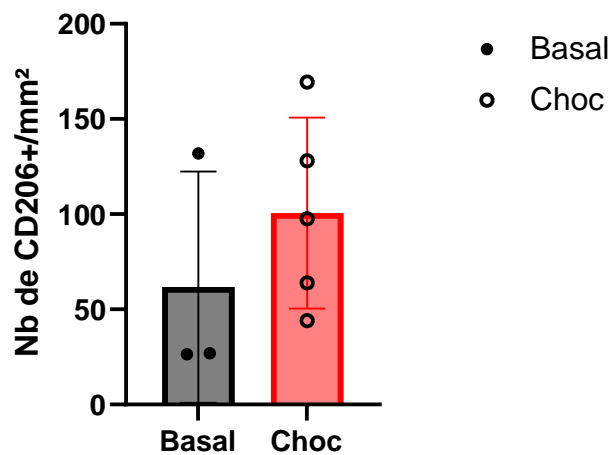


Figure 48 : Nombre de cellules marquées CD206 par mm² sur les échantillons de tissus pulmonaires de porcs du contrôle (basal) et soumis à un choc septique (choc). Les résultats représentent la moyenne ± SEM de 3 porcs basal et 3 porcs soumis au choc septique. Test statistique t-test. *p<0,05. Source : Eloïse Besson

5. Discussion

Etude de la mise en place des processus inflammatoires

L'analyse histologique effectuée a permis de confirmer la mise en place des processus inflammatoires dans le poumon et le foie après induction du choc septique chez les porcs. Ce processus inflammatoire semble être plus évident dans le poumon. Nos résultats sont dans l'ensemble en faveur d'une augmentation du nombre de cellules marquées, ici des macrophages, chez les porcs choc par rapport aux porcs basal.

Une fois l'inflammation pulmonaire confirmée, nous voulions déterminer des marqueurs des macrophages M1 et M2 porcins. Le choix des anticorps présentés a été fait selon les marqueurs décrits dans la littérature.

Le marqueur CD86 est décrit chez l'Homme comme marqueur des macrophages M1 pro-inflammatoires issus des monocytes. Le CD68 est important pour identifier les macrophages présents dans de nombreux tissus humains : les cellules de Kupffer du foie, les macrophages de la rate, ceux de la lamina propria de l'intestin, des alvéoles pulmonaires, mais également monocyte/macrophages dans la moelle osseuse ; c'est donc un marqueur des macrophages non spécifique (Genin et al. 2015; Li et al. 2023; Badylak et al. 2008; Cutolo et al. 2022; Boutilier, ElSawa 2021; Vogel et al. 2014; Barros et al. 2013). Comme nous avons pu l'observer, les marquages utilisant les anticorps anti-CD68 et anti-CD86 se sont révélés non satisfaisants sur les échantillons porcins car très sensibles mais peu spécifiques. En revanche, le marquage réalisé sur les échantillons pulmonaires humains s'est révélé satisfaisant. Il apparaît donc que les marqueurs CD68 et CD86 ne sont pas utilisables chez le porc en tant que marqueurs des macrophages tissulaires et des macrophages M1.

Nos résultats sont en accord avec Dawson et Lunney qui ont montré que le porc n'exprime pas le marqueur CD86 (Dawson, Lunney 2018).

Compte tenu de ces deux premiers résultats, nous avons cherché à tester d'autres marqueurs. Notre choix s'est porté vers le co-marquage CD14⁺CD163⁺ car Chamorro et al. ont décrit chez le porc une classe de monocytes CD163⁺, équivalent chez l'homme aux monocytes CD14⁺⁺CD16⁺ à tendance pro-inflammatoire. Chamorro et al. qualifient ces monocytes de classe intermédiaire : ils produisent une quantité intermédiaire de TNF- α après stimulation par un LPS et possèdent une capacité de présentation d'antigènes aux lymphocytes T supérieure à celle du sous-type de monocytes CD163⁺ CD14⁻. Nous avons donc considéré que les cellules doublement marquées CD14⁺CD163⁺ correspondent à des monocytes à tendance pro-inflammatoires donc donnant préférentiellement des macrophages M1. La réalisation de ce co-marquage s'est révélée relativement satisfaisante.

Nous avons obtenu une augmentation du nombre de cellules marquées statistiquement significative uniquement pour le marqueur CD163. Cette augmentation du nombre de macrophages témoigne de l'envahissement des tissus par des cellules immunitaires en lien avec l'initiation des processus inflammatoires. Ceci nous laisse supposer que le CD163 semble être un marqueur des macrophages M1 pro-inflammatoires. Ces données sont plus ou moins

contredites selon les articles de la littérature. En effet, le marqueur CD163 est considéré par certains comme marqueur des macrophages M2 chez l'Homme (Genin et al. 2015; Boutillier, ElSawa 2021; Singleton et al. 2016). Cependant, à ce stade, nous ne pouvons pas affirmer que ces macrophages sont des macrophages issus de monocytes infiltrés lors du processus inflammatoire, car le co-marquage CD14⁺ (marqueur spécifique de monocytes) et CD163⁺ s'est avéré peu concluant.

Concernant le marqueur des macrophages M2 chez le porc, nous avons porté notre choix sur un marqueur largement décrit chez l'Homme: le CD206 (Genin et al. 2015; Boutillier, ElSawa 2021). L'utilisation d'anticorps anti-CD206 a permis de réaliser un marquage sensible et spécifique des cellules. Notre étude permet donc de considérer le CD206 comme marqueur approprié des macrophages M2 chez le porc. Nos résultats sont en accord avec López-Robles et al. qui ont réalisé un marquage CD206 de macrophages sur un lavage broncho-alvéolaire porcin (López-Robles et al. 2015). De même, Singleton et al. ont utilisé le marqueur CD206 chez des macrophages issus de monocytes porcins différenciés *in vitro* (Singleton et al. 2016). Selon la littérature, les cellules CD206⁺ correspondent à des macrophages polarisés vers un état « anti-inflammatoire » dit M2, mais également à des macrophages dits résidents (Bautista et al. 2023; Nielsen et al. 2020). Il serait intéressant de savoir si les cellules ici marquées sont des macrophages résidents ou si elles correspondent à la mise en place des phénomènes anti-inflammatoires tels que décrits au cours du choc septique. Si c'est effectivement le cas, cela montrerait que la réponse anti-inflammatoire est mise en place précocement, nos analyses ayant été réalisées sur des échantillons obtenus seulement 2h30 après induction du choc septique. Il serait intéressant de réaliser un co-marquage CD14⁺CD206⁺ afin de conclure sur la nature des macrophages marqués CD206⁺.

Les prélèvements témoignent d'un état inflammatoire à un instant *t* mais ne permettent pas d'établir réellement une cinétique ni d'étudier précisément les mécanismes inflammatoires. Il serait intéressant d'avoir des échantillons prélevés à intervalles réguliers après le choc. Nous avons travaillé sur des échantillons de tissus, il est difficile d'effectuer plusieurs prélèvements invasifs dans le temps, tels que des biopsies pulmonaires ou hépatiques, au cours d'une même étude sur un même individu.

Nous avons ici analysé uniquement les échantillons pulmonaires, par manque de temps. Néanmoins, cette étude pourrait être menée également sur les échantillons de tissus hépatiques.

Quantification des cellules marquées

Comme présenté dans la partie Résultats, le nombre de cellules marquées a été quantifié à l'aide d'un protocole d'analyse d'images sur le logiciel QuPath. Nous avons remarqué que la qualité du marquage pouvait grandement influencer sur ces données. Par exemple, les échantillons marqués par l'anticorps anti-CD14 présentaient un bruit de fond d'intensité variable. Il a donc été plus difficile pour ce marqueur de discriminer clairement quelle cellule était marquée ou non. Cela a pu fausser les analyses car sur certains échantillons, de

nombreuses cellules ont été comptées comme CD14⁺ sans l'être (Annexe 4 Figure S1). Il est difficile de discerner à l'œil nu quelle cellule est positive. Or, la discrimination informatique nécessite de fournir au logiciel des exemples clairs de cellules marquées ou non marquées ce qui est compliqué dans notre cas. Les données de quantification cellulaire obtenues sont donc à utiliser avec précaution.

Nous avons utilisé deux méthodes de marquage et de révélation distinctes pour un même anticorps, l'anticorps anti-CD163 : le DAB et l'immunofluorescence. Nous avons donc voulu déterminer si elles sont équivalentes. Nous avons comparé les résultats obtenus concernant le nombre de cellules marquées par le protocole IHC (DAB) et le protocole Multiplex (immunofluorescence). Il s'avère que pour le même anticorps anti-CD163, le pourcentage de cellules marquées CD163 lors du protocole IHC est supérieur au pourcentage de cellules marquées lors du protocole Multiplex (Annexe 4 Figure S2). Cette différence est significative.

Il semblerait donc que protocole IHC permette un marquage plus sensible des cellules. Il est cependant difficile d'affirmer cela car la méthode de traitement des lames numérisées était différente. Le principe de comptage de cellules marquées est basé sur la reconnaissance de cellules portant une teinte particulière. Pour le protocole IHC, les cellules marrons étaient considérées comme positives alors que pour le protocole Multiplex, les cellules étaient colorées par le colorant Cyanine 5. Pour ces dernières, la gamme de couleur des cellules considérées comme positives était plus étendue que dans le protocole IHC. Cette variabilité colorimétrique plus grande a rendu l'analyse des images complexe et pourrait ainsi expliquer les différences dans les résultats obtenus.

Les analyses de lames ont été réalisées à l'aide du logiciel QuPath selon un protocole détaillé en annexe (Annexe 3). Deux outils distincts de détection cellulaire ont été utilisés. Les échantillons obtenus suite au protocole IHC ont été analysés à l'aide d'un outil rapide mais moins précis que celui utilisé pour les images en fluorescence. Le choix de la méthode a été fait selon la complexité des images à analyser et le matériel à disposition. Il a fallu environ 23h de traitement d'images à l'aide d'un ordinateur puissant pour détecter les cellules présentes sur les lames révélées par immunofluorescence. Le lecteur peut se référer à l'annexe 3 pour plus de précisions.

Choix de la technique d'immunohistochimie pour la discrimination des macrophages

L'un des objectifs de notre étude était de déterminer une méthode de reconnaissance et de marquage des macrophages simple et facilement reproductible. Nous avons testé le marquage par immunohistochimie qui est une méthode relativement simple et facilement exploitable : la qualité du marquage s'apprécie visuellement. Nous avons trouvé peu d'études dans la littérature exploitant cette technique chez le porc. On retrouve principalement des études utilisant la cytométrie de flux pour le triage de cellules sanguines ou obtenues après lavage broncho-alvéolaire selon les marqueurs CD qu'elles expriment (Chamorro et al. 2005; Singleton et al. 2016). A notre connaissance, notre étude est la première qui réalise le marquage de macrophages tissulaires pulmonaires par immunohistochimie. Les résultats

obtenus au travers des différents marquages a permis de confirmer la perspicacité de cette technique dans l'analyse d'échantillons tissulaires. L'immunohistochimie a pour avantage d'être plus visuelle que la cytométrie de flux. La lecture des lames est facilitée grâce aux différents logiciels présentés dans ce manuscrit. Néanmoins, l'analyse des images reste complexe et il existe des incertitudes probables dans la détermination du ou des marquages de chaque cellule.

Effectif et conditions expérimentales d'obtention des échantillons

Nous avons analysé au cours de notre étude des échantillons de tissus pulmonaires et hépatiques provenant de porcs basal et choc afin d'étudier la mise en place des processus inflammatoires à l'issue du choc septique. Pour rappel, la réaction inflammatoire est un processus dynamique comportant plusieurs phases successives. La première phase est la phase vasculo-exsudative. Elle comprend trois phénomènes : une congestion active, un œdème inflammatoire et une diapédèse leucocytaire. Vient ensuite la phase cellulaire avec envahissement des tissus par les cellules recrutées. Finalement, les phases de détersion, de réparation et cicatrisation concluent ce processus (Collège Français des Pathologistes (CoPath) 2012). Nous avons pu mettre en évidence au sein de nos échantillons la présence d'œdème en quantité faible à modérée. Cela est probablement en lien avec la courte durée séparant l'obtention des échantillons et l'initiation du processus inflammatoire : les porcs ont été euthanasiés 2h30 après le choc. Les modifications dans les échantillons que nous avons pu récupérer sont donc relativement précoces et au niveau histologique, on voit bien que les mécanismes inflammatoires sont débutants.

L'analyse des lames a révélé une infiltration cellulaire hétérogène au sein d'un même échantillon. Nous avons émis l'hypothèse que les zones de plus forte densité cellulaire pourraient être des zones d'embolisation bactérienne. Il serait intéressant de réaliser un marquage des bactéries afin de confirmer ou non cette corrélation.

Nous avons également observé une grande variabilité individuelle entre les échantillons. Certains porcs du groupe basal présentaient des motifs semblables aux motifs inflammatoires observés chez les porcs du groupe choc (Annexe 4 Figure S3). Cette remarque permet de rappeler que nous travaillons avec des animaux non consanguins et que cette hétérogénéité entre individus est attendue. Cette variabilité individuelle est inhérente à l'utilisation de modèles animaux non isogéniques. D'où la nécessité d'avoir un effectif suffisant afin d'avoir un échantillon représentatif d'une population.

Certains résultats obtenus dans notre étude sont à analyser avec précaution car les valeurs ne passent pas les tests de normalité compte tenu d'un N trop faible (notamment pour la quantification des cellules marquées sur les lames où N=3). Néanmoins, à l'échelle de notre étude, il apparaissait difficile de proposer un N beaucoup plus important, d'un point de vue financier ou de faisabilité. Il serait intéressant d'envisager par la suite une étude de plus grande ampleur afin d'obtenir des résultats statistiquement recevables.

Nous pouvons nous questionner également sur l'influence des conditions d'obtention des prélèvements sur la qualité et les caractéristiques de ceux-ci. Tout d'abord, les porcs ayant été intubés, nous pouvons nous demander si cet acte peut déjà être à l'origine d'une irritation voire inflammation au niveau des tissus pulmonaires. Cependant, tous les porcs ont été traités selon le même protocole donc ce biais est commun à tous les individus.

Ensuite, les échantillons ayant été obtenus après euthanasie des animaux, il est légitime de se questionner sur les interactions potentielles de la solution euthanasiant avec les tissus pulmonaires. Le T61 contient de la tétracaïne (anesthésique local), de l'embutramide (ayant un puissant effet narcotique et paralysant le centre respiratoire) et du mébézonium (curare qui « paralyse les muscles striés et ceux de l'appareil respiratoire et provoque un collapsus circulatoire rapide ») (T61, MSD Santé Animale, Beaucouze, France). Il serait intéressant d'étudier l'effet potentiel de ce produit, en analysant par exemple des échantillons de tissus pulmonaires obtenus après euthanasie de porcs pour les comparer avec des échantillons obtenus après sacrifice sans aide médicamenteuse, mais ce type d'expérience reste très discutable au niveau éthique.

6. Perspectives

Comme présenté au sein de la discussion, certains de nos résultats sont à analyser avec précaution compte tenu d'un N trop faible, notamment pour l'étude des lames marquées. Il serait intéressant de réitérer la quantification des cellules marquées sur un plus grand nombre d'échantillons. De plus, les différentes études réalisées sur les échantillons pulmonaires pourraient tout à fait être réalisées de la même manière sur les échantillons hépatiques. Cela n'a pas été effectué pour cette thèse par manque de temps.

Certains marquages réalisés n'ont pas été concluants, notamment pour les macrophages M1. Il serait intéressant de poursuivre les tests de différents marqueurs décrits chez l'Homme afin d'en trouver d'autres qui puissent être utilisés sur les échantillons pulmonaires porcins. Les marqueurs CD40 et CD64 pourraient également être testés, car décrits comme marqueurs des macrophages M1 chez l'Homme (Tableau II). Ensuite, d'autres co-marquages, comme le CD14⁺CD206⁺, pourraient être réalisés afin de discriminer les macrophages issus des monocytes des macrophages résidents. Il pourrait également être envisagé d'utiliser des anticorps ayant comme espèce réactive le porc afin d'espérer une interaction anticorps/antigène supérieure à celle observée avec les anticorps utilisés dans notre étude, habituellement utilisés sur des échantillons d'humains, de souris ou de rats.

CONCLUSION

Ce travail portait sur l'évaluation du potentiel immunologique du porc dans un modèle de choc septique. Nos recherches bibliographiques ont tout d'abord permis de mettre en évidence les nombreuses similitudes anatomiques, physiologiques et immunologiques existantes entre l'Homme et le porc, justifiant son utilisation dans l'étude du profil des macrophages lors du choc septique.

L'analyse histologique des tissus pulmonaires a permis de confirmer la mise en place de processus inflammatoires, caractérisés par la présence d'œdème intra-alvéolaire, d'une forte densité cellulaire et d'un infiltrat inflammatoire dans les poumons des porcs choc. Les échantillons hépatiques des porcs choc présentaient également des motifs inflammatoires.

Le marquage des tissus pulmonaires par immunohistochimie s'est révélé plus ou moins concluant selon les marqueurs utilisés. Le marquage avec les anticorps anti-CD68 et anti-CD86 des macrophages tissulaires et des macrophages M1 semble être non spécifique dans les tissus pulmonaires porcins. A l'inverse, ces marquages réalisés sur les tissus pulmonaires humains sont plus sensibles et plus spécifiques.

L'utilisation des anticorps anti-CD206 et anti-CD163 sur les échantillons pulmonaires porcins permet de réaliser un marquage spécifique des macrophages. Nous avons également pu mettre en évidence une augmentation significative du nombre de cellules CD163⁺, tandis que le nombre de cellules CD206⁺ reste inchangé. Ceci nous laisse supposer que le CD163 semble être un marqueur de macrophages M1 pro-inflammatoire chez le porc et le CD206 un marqueur des macrophages résidents tissulaires.

Les marqueurs des macrophages M2 ont donc bien été validés pour les tissus pulmonaires porcins. En revanche, d'autres marqueurs spécifiques des macrophages M1 restent à être testés.

L'utilisation de l'immunohistochimie dans cette étude s'est révélée satisfaisante et cette technique pourrait être utilisée dans d'autres études concernant le phénotypage des macrophages au sein de tissus porcins. Un protocole de quantification des cellules marquées à l'aide du logiciel QuPath a démontré sa pertinence, ce protocole pourrait être ré-utilisé au cours d'études nécessitant la quantification de cellules marquées au sein d'échantillons tissulaires.

Comme évoqué dans ce travail, au cours des mécanismes de l'immunité innée mis en place lors du sepsis, on est face à une dérégulation entre mécanismes pro et anti-inflammatoires. L'incapacité du système immunitaire à contrôler cette infection pourrait impliquer les macrophages. Les résultats de nos travaux pourront contribuer aux recherches sur le choc septique afin d'augmenter la compréhension des mécanismes inflammatoire mis en jeu lors du sepsis et espérer affiner les diagnostics et prises en charge thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEJANDRO GÓMEZ, F., BALLESTEROS, L.E., STELLA CORTÉS, L. (2015). Morphological description of great cardiac vein in pigs compared to human hearts. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular : órgão oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 30(1), pp. 63-69. DOI 10.5935/1678-9741.20140101.
- ARASSE, D. (2019). *Léonard de Vinci : Le rythme du monde*. Paris : Hazan, 540p.
- ARISTOTE (1542). *De Generatione Animalium*. Paris : Prigent Calvarin, 590p.
- ARISTOTE (1910). *Historia Animalium*. Oxford : The Clarendon Press, 508p.
- BACHA, W.J. et BACHA, L.M. (2012). *Color Atlas of Veterinary Histology*. 3e ed. UK: Wiley-Blackwell, 368p.
- BADYLAK, S.F., VALENTIN, J.E., RAVINDRA, A.K., MCCABE, G.P. et STEWART-AKERS, A.M. (2008). Macrophage Phenotype as a Determinant of Biologic Scaffold Remodeling. *Tissue Engineering Part A*, 14(11), pp. 1835-1842. DOI 10.1089/ten.tea.2007.0264.
- BANKHEAD, P., LOUGHREY, M.B., FERNÁNDEZ, J.A., DOMBROWSKI, Y. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>.
- BARROS, M., HAUCK, F., DREYER, J., KEMPKES, B., NIEDOBITEK, G. (2013). Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE*, 8(11). DOI 10.1371/journal.pone.0080908.
- BAUTISTA, C. A., SRIKUMAR, A., TICHY, E. D., QIAN, G., JIANG, X., QIN, L., MOURKIOTI, F., DYMENT, N. A. (2023). CD206+ tendon resident macrophages and their potential crosstalk with fibroblasts and the ECM during tendon growth and maturation. *Frontiers in Physiology*, 14, pp. 1122348. DOI 10.3389/fphys.2023.1122348.
- BELON, P. (1555). *Histoire de la nature des oyseaux, avec leurs descriptions et naïfs portraits retirez du naturel*. London : The Wellcome Library, 420p.
- BERNARD, C. (1865). *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Paris : J.B. Baillière et Fils, 398p.
- BODES, F.J.S., MARTINEZ, F.J.P. (2023). *Aughey and Frye's Comparative Veterinary Histology with Clinical Correlates*. 2e ed. Oxford: CRC Press, 268p.
- BORDET, E. et al (2018). Porcine Alveolar Macrophage-like cells are pro-inflammatory Pulmonary Intravascular Macrophages that produce large titers of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Scientific Reports*, 8(1), pp. 10172. DOI 10.1038/s41598-018-28234-y.
- BOUTILIER, A.J., ELSAWA, S.F. (2021). Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), pp. 6995. DOI 10.3390/ijms22136995.

BRAIN, J. D., MOLINA, R. M., DECAMP, M. M., WARNER, A. E. (1999). Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species. *The American Journal of Physiology*, 276(1), pp.146-154. DOI 10.1152/ajplung.1999.276.1.L146.

BRETSCHNEIDER, H. (1962). *Der Streit um die Vivisektion im 19e Jahrhundert*. Stuttgart: G. Fisher, 158p.

Code Civil., art.528, Loi 1804-01-25 promulguée le 4 février 1804

Code Civil, art. 514-14, relatif à la modernisation et à la simplification du droit et des procédures

Code rural, art. R214-87 à R214-137, relatifs à l'utilisation d'animaux vivants à des fins scientifiques

CAVAILLON, J-M., SINGER, M., SKIRECKI, T. (2020). Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. *EMBO Molecular Medicine*, 12(4). 7 avril 2020. Vol. 12, n° 4, pp. 1-24. DOI 10.15252/emmm.201810128.

Cell Signaling Technology. Fluorescent Multiplex Immunohistochemistry [en ligne]. URL. Disponible à l'adresse : <https://www.cellsignal.com/applications/immunohistochemistry/fluorescence-mihc>. [Consulté le 6 août 2023]

CHAMORRO, S., REVILLA, C., ÁLVAREZ, B., ALONSO, F., EZQUERRA, Á., DOMÍNGUEZ, J. (2005). Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology*, 114(1), pp. 63-71. DOI 10.1111/j.1365-2567.2004.01994.x.

CHAPOUTHIER, G. (1998). *The universal declaration of animal rights, comments and intentions*. Paris : Edition Ligue Française des Droits de l'animal, 93p.

CHEN, X., LIU, Y., GAO, Y., SHOU, S., CHAI, Y. (2021). The roles of macrophage polarization in the host immune response to sepsis. *International Immunopharmacology*, 96, pp. 107791. DOI 10.1016/j.intimp.2021.107791.

Collège Français des Pathologistes (COPATH). La réaction inflammatoire. Les inflammations [en ligne]. URL : https://archives.uness.fr/sites/campus-unf3s-2014/anatomiepathologique/enseignement/anapath_3/site/html/cours.pdf. [Consulté le 11 juillet 2023]

CORDINGLEY, J. L. (1972). Pores of Kohn. *Thorax*, 27(4), pp. 433-441. DOI 10.1136/thx.27.4.433.

CRICK, SIMON J., SHEPPARD, MARY N., HO, SIEW YEN, GEBSTEIN, LIOR, ANDERSON, ROBERT H. (1998). Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *Journal of Anatomy*, 193(1), pp. 105-119. DOI 10.1046/j.1469-7580.1998.19310105.x.

CROSS-NAJAFI, A.A., LOPEZ, K., ISIDAN, A., PARK, Y., ZHANG, W., LI, P., YILMAZ, S., AKBULUT, S. et EKSER, B. (2022). Current Barriers to Clinical Liver Xenotransplantation. *Frontiers in Immunology*, 13, pp. 827535. DOI 10.3389/fimmu.2022.827535.

CUTOLO, M., CAMPITIELLO, R., GOTELLI, E. et SOLDANO, S. (2022). The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Frontiers in Immunology*, 13, pp. 867260. DOI 10.3389/fimmu.2022.867260.

DAWSON, H.D. et al (2013). Structural and functional annotation of the porcine immunome. *BMC Genomics*, 14(1), pp. 332. DOI 10.1186/1471-2164-14-332.

DAWSON, H.D., LUNNEY, J.K. (2018). Porcine cluster of differentiation (CD) markers 2018 update. *Research in Veterinary Science*, 118, pp. 199-246. DOI 10.1016/j.rvsc.2018.02.007.

Direction générale de la recherche et de l'innovation. Utilisation d'animaux à des fins scientifiques dans les établissements français – Enquête statistique 2021 [en ligne]. URL : <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/sites/default/files/2023-02/enqu-te-2021-utilisation-des-animaux-des-fins-scientifiques-26480.pdf> [Consulté le 10 février 2022]

EKSER, B., BURLAK, C., WALDMAN, J.P., LUTZ, A.J., PARIS, L.L., VEROUX, M., ROBSON, S.C., REES, M.A., AYARES, D., GRIDELLI, B., TECTOR, A.J. et COOPER, D.K. (2012). Immunobiology of liver xenotransplantation. *Expert review of clinical immunology*, 8(7), pp. 621-634. DOI 10.1586/eci.12.56.

FAIRBAIRN, L., KAPETANOVIC, R., SESTER, David P. et HUME, D.A. (2011). The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(6), pp. 855-871. DOI 10.1189/jlb.1110607.

FAYOLLE, A. (2020). L'animal expérimental de Claude Bernard. *Animal Humanité*. Champs sur Marne : LISAA éditeur, pp. 159-174.

GACHELIN, G. (2022). Projet Génome Humain [en ligne]. *Encyclopædia Universalis*. Disponible sur : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/projet-genome-humain/> [Consulté le 21 novembre 2022].

GENIN, M., CLEMENT, F., FATTACCIOLI, A., RAES, M., MICHIELS, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15, pp.577. DOI 10.1186/s12885-015-1546-9.

Gircor, L'équipe. Infographie – Les utilisations d'animaux par la recherche française en 2021 [en ligne]. URL : <https://www.gircor.fr/infographie-les-utilisations-danimaux-par-la-recherche-francaise-en-2021/> [Consulté le 9 juin 2023]

Global Alliance Sepsis. Sepsis Basics [en ligne]. URL: <https://www.global-sepsis-alliance.org/sepsis>. [Consulté le 10 juillet 2023]

GORDON, S., MARTINEZ, F.O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*, 32(5), pp. 593-604. DOI 10.1016/j.immuni.2010.05.007.

GRANDMOUGIN, D. et al (2016). Anatomie du cœur porcine. Similitudes et différences principales avec le cœur humain et conséquences potentielles en chirurgie cardiaque expérimentale porcine. *Journal de chirurgie thoracique et cardio-vasculaire*. DOI 10.24399/JCTCV20—3-GRA.

GREENWALD, N.F. et al. (2022). Whole-cell segmentation of tissue images with human-level performance using large-scale data annotation and deep learning. *Nature Biotechnology*, 40(4), pp. 555-565. DOI 10.1038/s41587-021-01094-0.

GREINER, M., WOLF, G., HARTMANN, K. (2008). A retrospective study of the clinical presentation of 140 dogs and 39 cats with bacteraemia. *Journal of Small Animal Practice*, 49(8), pp. 378-383. DOI 10.1111/j.1748-5827.2008.00546.x.

GUILBAULT, C., SAEED, Z, P. DOWNEY, G., RADZIOCH, D. (2007). Cystic Fibrosis Mouse Models. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 36(1), pp. 1-132. DOI: 10.1165/rcmb.2006-0184TR.

GUILLEMOT, D. (2021). Sepsis / septicémie [en ligne] *Institut Pasteur*. [en ligne] URL: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/sepsis-septicemie> [Consulté le 4 juillet 2023].

HARVEY, W. (1628). *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*. Springfield : Thomas, 268p.

HRYHOROWICZ, M., ZEYLAND, J, SŁOMSKI, R., LIPIŃSKI, D. (2017). Genetically Modified Pigs as Organ Donors for Xenotransplantation. *Molecular Biotechnology*, 59(9), pp. 435-444. DOI 10.1007/s12033-017-0024-9.

Institut Pasteur. Elie Metchnikoff (1845-1916) [en ligne]. URL : https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/elie-metchnikoff-prix-nobel-1908institutpasteur_elie-metchnikoff.jpg [Consulté le 22 mai 2023]

JARCZAK, D., KLUGE, S., NIERHAUS, A. (2021). Sepsis—Pathophysiology and Therapeutic Concepts. *Frontiers in Medicine*, 8, pp. 628302. DOI 10.3389/fmed.2021.628302.

JOUBERT, H., PÉRON, J-M., BUREAU, C. (2020). Transplantation hépatique (greffe du foie) [en ligne]. URL : <https://www.snfge.org/content/transplantation-hepatique-greffe-du-foie>. [Consulté le 24 mai 2023]

JUDGE, E., HUGHUES, L., EGAN, J., MAGUIRE, M., MOLLOY, E., O’DEA, S. (2014). Anatomy and Bronchoscopy of the Porcine Lung. A Model for Translational Respiratory Medicine. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(3), pp. 334-343. DOI 10.1165/rcmb.2013-0453TR.

KING, E.G., BAUZÀ, G.J., MELLA, J.R., REMICK, D.G. (2014). Pathophysiologic mechanisms in septic shock. *Laboratory Investigation*, 94, pp. 4-12. DOI 10.1038/labinvest.2013.110.

KRUEPUNGA, N., HAKVOORT, T.B.M., HIKSPOORS, J.P.J.M., KÖHLER, S.E., LAMERS, W.H., 2019. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(5), pp. 869-878. DOI 10.1016/j.bbadis.2018.05.019.

Loi n°2261, 15 mars, 13 juin et 2 juillet 1850, relative aux mauvais traitements exercés envers les animaux domestiques.

Loi n°63-1143, 19 novembre 1963, art.453, relative à la protection des animaux. URL : <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000684280>

Loi n°76-629, 10 juillet 1976, art. 9, relative à la protection de la nature. URL : <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000006068553/2021-01-22/>

LARATTE, Aubin (2022). Un cœur de porc greffé sur un humain : 5 minutes pour comprendre une «prouesse». [en ligne]. URL : <https://www.leparisien.fr/societe/un-coeur-de-porc-greffe-sur-un-humain-5-minutes-pour-comprendre-une-prouesse-11-01-2022-H2NRZYHH6NCMNDHDQ3QJOPY3EQ.php> [Consulté le 3 décembre 2022]

LELOVAS, P.P., KOSTOMITSOPOULOS, N.G., XANTHOS, T.T. (2014). A Comparative Anatomic and Physiologic Overview of the Porcine Heart. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS.*, 53(5), pp. 432-438.

LI, J., YUAN, T., ZHANG, A., YANG, P., HE, L., LONG, K., TANG, C., CHEN, L., LI, M., LU, L. (2023). Transcriptomic Establishment of Pig Macrophage Polarization Signatures. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(3), pp. 2338-2350. DOI 10.3390/cimb45030151.

LIEBICH, H-G. (2019). *Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds*. 5e ed. Sheffield : 5M Publishing Ltd, 414p.

LONGWORTH, K.E. (1997). The comparative biology of pulmonary intravascular macrophages. *Frontiers in Bioscience-Landmark*; 2(4), pp. 232-241. DOI 10.2741/A186.

LÓPEZ-ROBLES, G., SILVA-CAMPA, E., BURGARA-ESTRELLA, A., HERNÁNDEZ, J. (2015). Characterization of antigen-presenting cells from the porcine respiratory system. *Research in Veterinary Science*, 100, pp. 80-87. DOI 10.1016/j.rvsc.2015.04.009.

LUNNEY, J.K. (2007). Advances in Swine Biomedical Model Genomics. *International Journal of Biological Sciences*, 3(3), pp. 179-184.

MAGNIN, M. (2021). Évaluation des troubles de la perfusion tissulaire dans les états de chocs circulatoires et de l'intérêt thérapeutique du pimobendane : de la recherche expérimentale aux applications cliniques. [en ligne]. These de doctorat. Lyon : Université Claude Bernard, 282p. URL : <https://www.theses.fr/2021LYSE1087>

MAIR, K. H., SEDLAK, C., KÄSER, T., PASTERNAK, A., LEVAST, B., GERNER, W., SAALMÜLLER, A., SUMMERFIELD, A., GERDTS, V., WILSON, H. L., MEURENS, F. (2014). The porcine innate immune system: An update. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(2), pp. 321-343. DOI 10.1016/j.dci.2014.03.022.

MAKOWA, L., CRAMER, D. V., HOFFMAN, A., BREDA, M., SHER, L., EIRAS-HREHA, G., TUSO, P. J., YASUNAGA, C., COSENZA, C. A., WU, G. D. (1995). The use of a pig liver xenograft for temporary support of a patient with fulminant hepatic failure. *Transplantation*, 59(12), pp. 1654-1659. DOI 10.1097/00007890-199506270-00002.

MALE, D., BROSTOFF, J., ROTH, D.B., ROITT, I. (2007). *Immunologie*. 7^e ed. US :Elsevier/Saunders, 591p.

MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A., LOCATI, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), pp. 677-686. DOI 10.1016/j.it.2004.09.015.

MARTINEZ, F.O., SICA, A., MANTOVANI, A., LOCATI, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 13(2), pp. 453-461. DOI 10.2741/2692.

MEURENS, F., SUMMERFIELD, A., NAUWYNCK, H., SAIF, L., GERDTS, V. (2012). The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology*, 20(1), pp. 50-57. DOI 10.1016/j.tim.2011.11.002.

Ministère de la Santé et de la Prévention (2023a). Maladies cardiovasculaires [en ligne]. URL: <https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/maladies/maladies-cardiovasculaires/article/maladies-cardiovasculaires>. [Consulté le 9 juin 2023]

Ministère de la Santé et de la Prévention (2023b). Prévention et prise en charge du sepsis [en ligne]. URL: <https://sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/article/prevention-et-prise-en-charge-du-sepsis>. [Consulté le 4 juillet 2023]

MOLLIER, P. (2022). Les organoïdes : des organes miniatures aujourd'hui incontournables pour la biologie et la médecine [en ligne]. URL: <https://www.inrae.fr/actualites/organoides-organes-miniatures-aujourd'hui-incontournables-biologie-medecine>. [Consulté le 28 juillet 2023]

MONTEALEGRE, F., LYONS, B.M. (2021). Fluid Therapy in Dogs and Cats With Sepsis. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, pp. 622127. DOI 10.3389/fvets.2021.622127.

MURAILLE, E. (2021). Interdiction de l'expérimentation animale en Europe : quelles conséquences pour la recherche scientifique? [en ligne]. URL : <https://www.lejdd.fr/Societe/interdiction-de-l-experimentation-animale-en-europe-quelles-consequences-pour-la-recherche-scientifique-4073795>. [Consulté le 24 novembre 2022]

NAU, Y. (2002). Le séquençage du génome de la souris est achevé [en ligne]. 5 décembre 2002. URL : https://www.lemonde.fr/planete/article/2002/12/05/le-sequencage-du-genome-de-la-souris-est-acheve_300906_3244.html. [Consulté le 21 novembre 2022]

NESSELER, N., MATTHAY, M.A., SEGUIN, P., NESSELER, N. Choc septique : définitions, épidémiologie, monitoring et principes thérapeutiques. In : Nessler N. Le Congrès, conférence d'Essentiel, 2017, Paris, 20p.

NIELSEN, O.L. et al. (2009). A pig model of acute Staphylococcus aureus induced pyemia. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1), pp. 14. DOI 10.1186/1751-0147-51-14.

NIELSEN, M., HVIDBJERG GANTZEL, R., CLÀRIA, J., TREBICKA, J., MØLLER, H. et GRØNBÆK, H. (2020). Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Cells*, 9(5), pp. 1175. DOI 10.3390/cells9051175.

NTONAS, A., KATSOURAKIS, A., GALANIS, N., FILO, E., NOUSSIOS, G. (2020). Comparative Anatomical Study Between the Human and Swine Liver and Its Importance in Xenotransplantation. *Cureus*, 12(7). 2020. Vol. 12. DOI 10.7759/cureus.9411.

OWEN, J.A., PUNT, J., STRANFORD, S.A. (2013). Immunologie. Le cours de Janis Kuby. 7^e ed. Paris : Dunod, 832p.

PABST, R. (2020). The pig as a model for immunology research. *Cell and Tissue Research*, 380(2), pp. 287-304. DOI 10.1007/s00441-020-03206-9.

PASTORET, P-P., GOVAERTS, A., BAZIN, H. (1990). Immunologie Animale. Paris : Flammarion, 740p.

PÉCOT, T., ALEKSEYENKO, A., WALLACE, K. (2022). A deep learning segmentation strategy that minimizes the amount of manually annotated images. *F1000Research*. DOI: 10.12688/f1000research.52026.2

SAITO, S., UCHINO, S., HAYAKAWA, M., YAMAKAWA, K., KUDO, D., IIZUKA, Y., SANUI, M., TAKIMOTO, K., MAYUMI, T., SASABUCHI, Y. (2019). Epidemiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis and validation of scoring systems. *Journal of Critical Care*, 50, pp. 23-30. DOI 10.1016/j.jcrc.2018.11.009.

SALMINEN, A. (2022). Role of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) and kynurenine pathway in the regulation of the aging process. *Ageing Research Reviews*, 75, pp. 101573. DOI 10.1016/j.arr.2022.101573.

SÁNCHEZ, C., DOMÉNECH, N., VÁZQUEZ, J., ALONSO, F., EZQUERRA, A., DOMÍNGUEZ, J. (1999). The Porcine 2A10 Antigen Is Homologous to Human CD163 and Related to Macrophage Differentiation1. *The Journal of Immunology*, 162(9), pp. 5230-5237. DOI 10.4049/jimmunol.162.9.5230.

SCHMIDT, U., WEIGERT, M., BROADDUS, C., MYERS, G. (2018). *Cell Detection with Star-convex Polygons*. In A. F. Frangi (Ed.), *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention - MICCAI 2018 : 21st International Conference, Granada, Spain, September 16-20, 2018, Proceedings, Part II* (pp. 265-273).

SINGER, M. et al (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), pp. 801-810. DOI 10.1001/jama.2016.0287.

SINGLETON, H., GRAHAM, S.P., BODMAN-SMITH, K.B., FROSSARD, J-P., STEINBACH, F. (2016). Establishing Porcine Monocyte-Derived Macrophage and Dendritic Cell Systems for Studying the Interaction with PRRSV-1 [en ligne]. *Frontiers in Microbiology*, 7. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00832>. [Consulté le 20 juillet 2023]

TEDGUI, A. (2017). Athérosclérose · Inserm, La science pour la santé [en ligne]. URL : <https://www.inserm.fr/dossier/atherosclerose/> [Consulté le 22 décembre 2022].

THIBAUD, R., VINCKE, G., DEPIEREUX, E., RAES, M. (2018). Atlas d'Histologie humaine et animale. [en ligne]. URL: <https://webapps.unamur.be/umdb/histohuma/histohuma/index.php?go=img&chap=49&pos=9#topimg>. [Consulté le 22 décembre 2022]

TIZARD, I.R. (2013). *Veterinary Immunology*. 9e ed. Missouri: Elsevier Saunders, 552p.

TOLEDO-PEREYRA, L.H. (2008). *Exercitatio Anatomica De Motus Cordis et Sanguinis in Animalibus Surgical Revolution*. *Journal of Investigative Surgery*, 21(6)., pp. 302-310. DOI 10.1080/08941930802511603

VAN FURTH, R., COHN, Z.A., HIRSCH, J.G., HUMPHREY, J.H., SPECTOR, W.G., LANGEVOORT, H.L. (1972). Le système phagocytaire mononucléaire: nouvelle classification des macrophages, des monocytes et de leurs cellules souches. *Bulletin of the World Health Organization*, 47(5), pp. 651-658.

VERGONJEANNE, R. (2012) Le séquençage du génome du porc ouvre de nouvelles perspectives [en ligne]. URL: <https://www.web-agri.fr/conduite-elevage/article/84759/le-sequencage-du-genome-du-porc-ouvre-de-nouvelles-perspectives>. [Consulté le 21 novembre 2022]

VESALIUS, A. (1543). *De Humanus Corporis Fabrica Libri Septem*. Basilaee : Per Joannem Oporinum, 883p.

VOGEL, D.Y.S., GLIM, J.E., STAVENUITER, A.W.D., BREUR, M., HEIJNEN, P., AMOR, S., DIJKSTRA, C.D., BEELEN, R.H.J. (2014). Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 219(9), pp. 695-703. DOI 10.1016/j.imbio.2014.05.002.

WALTERS, E.M., WOLF, E., WHYTE, J.J., MAO, J., RENNER, S., NAGASHIMA, H., KOBAYASHI, E., ZHAO, J., WELLS, K.D., CRITSER, J.K., RILEY, L.K., PRATHER, R.S. (2012). Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Medical Genomics*, 5, pp. 55. DOI 10.1186/1755-8794-5-55.

WARDLE, E.N. (1987). Kupffer cells and their function. *Liver*, 7(2), pp. 63-75. DOI 10.1111/j.1600-0676.1987.tb00319.x.

World Health Organization (2020). Sepsis. [en ligne]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>. [Consulté le 4 juillet 2023]

XIAO, L. et al (2016). A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nature Microbiology*, 1, pp. 16161. DOI 10.1038/nmicrobiol.2016.161.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. (2014). Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. *Cellular Immunology*, 291(1), pp. 11-15. DOI 10.1016/j.cellimm.2014.06.008.

Annexe 1 : Poster pédagogique visant à réduire la prévalence du choc septique par sensibilisation des populations. Présentation des populations à risque.

POPULATION À RISQUE
Le sepsis peut atteindre chacun d'entre nous - certains sont plus exposés:



Immunodéprimés
p.e. SIDA, Diabète



Splenectomisés



Personnes atteintes de
maladies chroniques des
poumons, du foie ou du cœur



Enfants de moins de 1 an



Adultes de plus
de 60 ans



stop
sepsis
save
lives

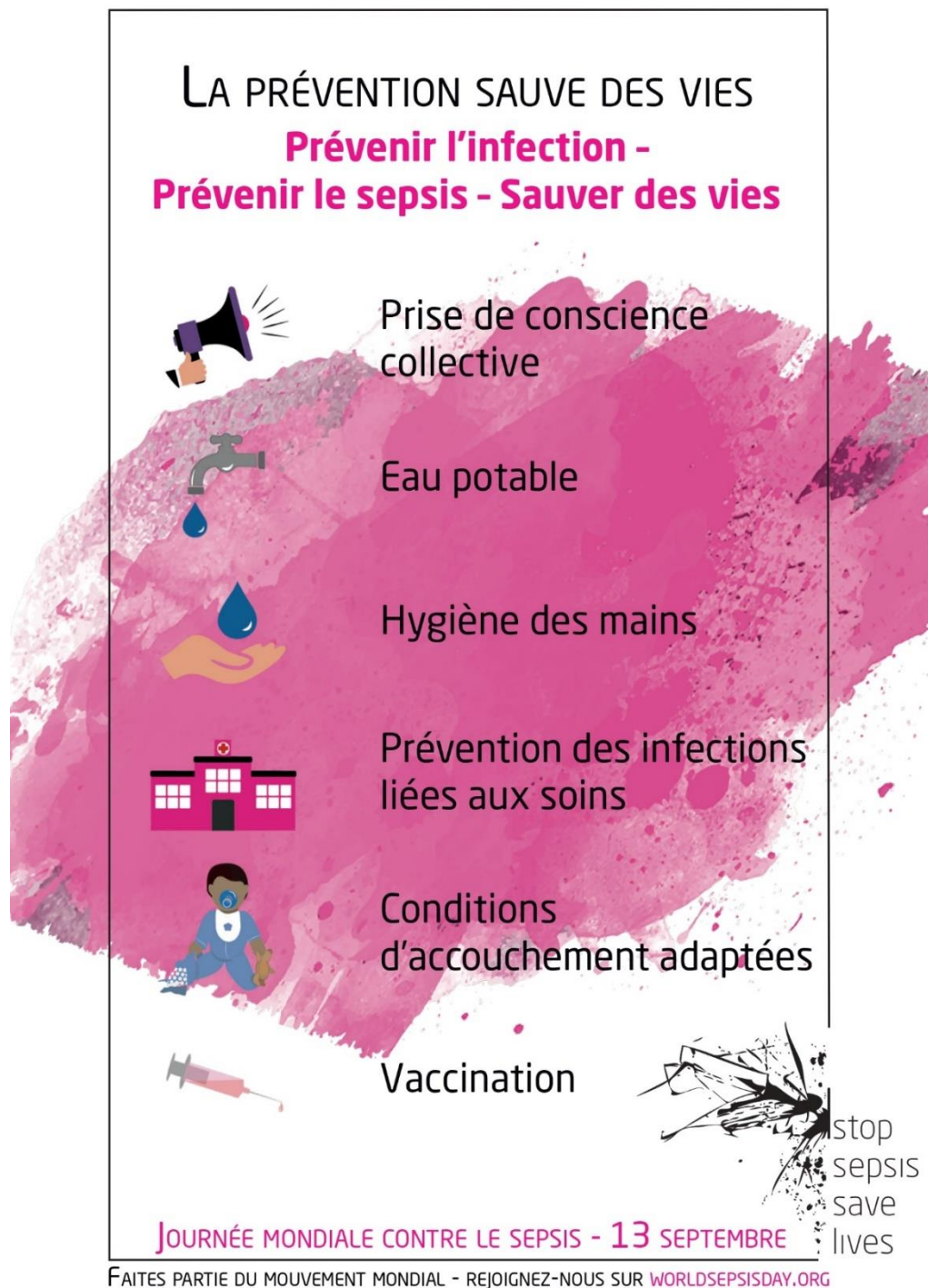
JOURNÉE MONDIALE CONTRE LE SEPSIS - 13 SEPTEMBRE

FAITES PARTIE DU MOUVEMENT MONDIAL - REJOIGNEZ-NOUS SUR WORLDSEPSISDAY.ORG

Source : <https://www.worldsepsisday.org/toolkits>

Annexe 2 : Poster pédagogique visant à réduire la prévalence du choc septique par sensibilisation des populations. Conseils pour la prévention des infections.

LA PRÉVENTION SAUVE DES VIES
Prévenir l'infection -
Prévenir le sepsis - Sauver des vies



Prise de conscience collective

Eau potable

Hygiène des mains

Prévention des infections liées aux soins

Conditions d'accouchement adaptées

Vaccination

stop
sepsis
save
lives

JOURNÉE MONDIALE CONTRE LE SEPSIS - 13 SEPTEMBRE

FAITES PARTIE DU MOUVEMENT MONDIAL - REJOIGNEZ-NOUS SUR WORLDSEPSISDAY.ORG

Source : <https://www.worldsepsisday.org/toolkits>

Annexe 3 : Protocole d'utilisation du logiciel Qupath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées

1- Objet et domaine d'application :

Nous proposons ici un protocole d'utilisation du logiciel QuPath (Bankhead et al. 2017). Il s'agit d'un logiciel open source gratuit utilisé pour l'analyse d'images biologiques. Il est facilement téléchargeable sur n'importe quel système d'exploitation (Windows, Mac, Linux). Ce document présente un protocole simple et détaillé afin d'analyser et d'exploiter des lames contenant des échantillons tissulaires. Avant toute analyse, il est conseillé de créer un dossier contenant l'ensemble des lames à analyser. Les différents scripts ou extensions présentés seront à inclure dans ce même dossier.

2 Procédure

○ Importer un dossier

File – Projet – Open Project.

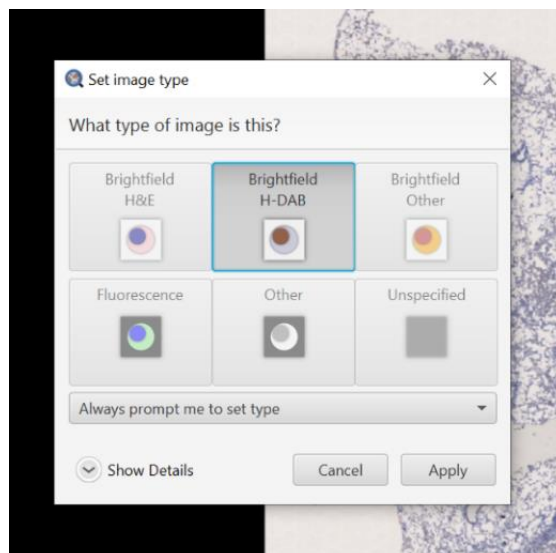
Il suffit de choisir le dossier précédemment créé.

Il est également possible d'importer seulement quelques lames individuellement.

○ Importer une lame pour analyse

File – Open – Import – Choisir le type d'image que l'on va importer.

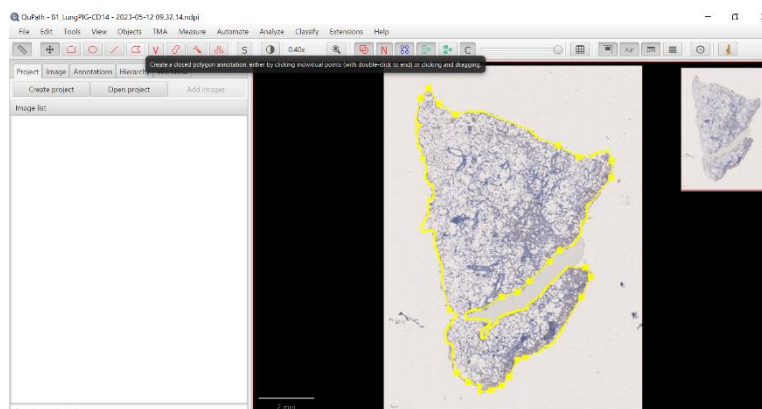
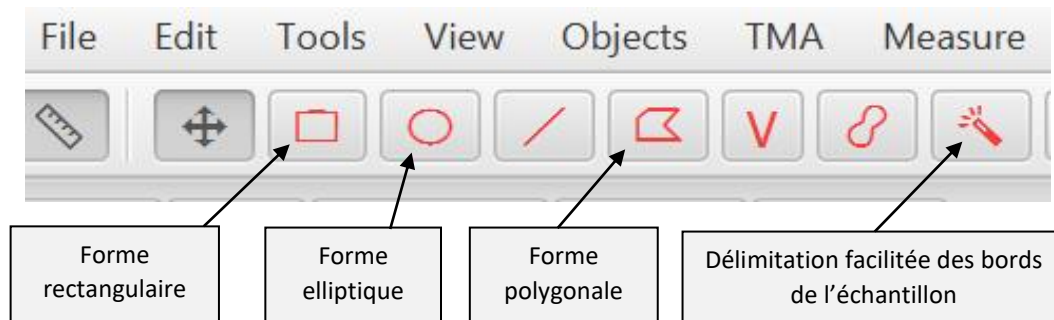
La lame est alors importée dans le logiciel.



UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 2 sur 14

- Détecter les cellules présentes sur l'image

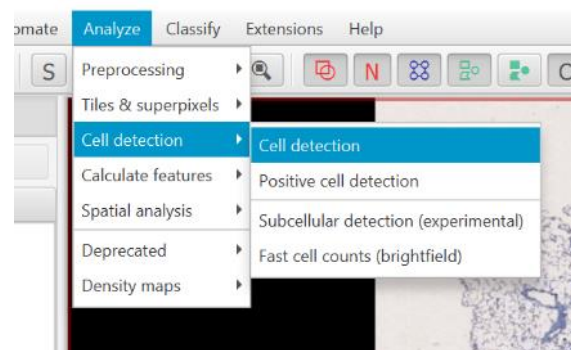
1) Définir la zone d'étude à l'aide des outils à disposition



Nous avons maintenant délimité notre zone d'analyse, ici la totalité de l'échantillon. Il existe 2 méthodes de détection cellulaire : l'une simple, rapide mais moins précise disponible directement dans le logiciel ; l'autre plus lente mais plus précise qui sera décrite plus loin.

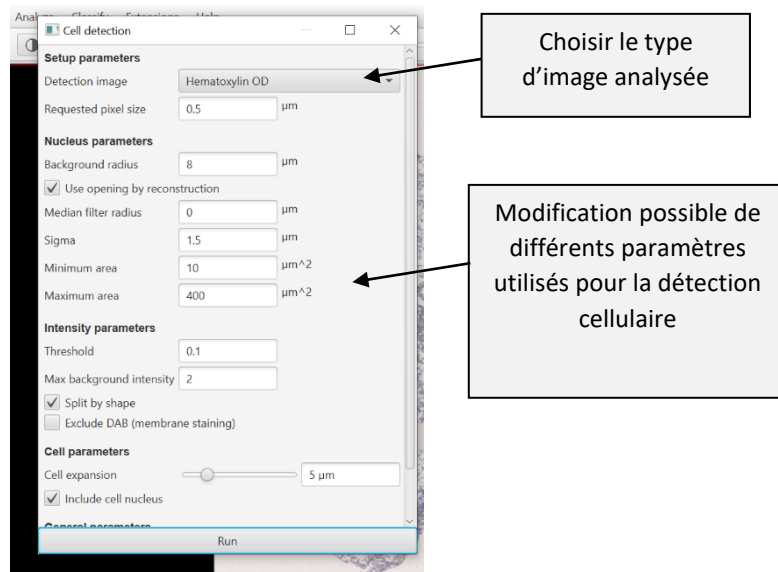
1.a) Détection cellulaire à l'aide de l'outil *Cell Detection* du logiciel

Choisir Analyze – Cell Detection – Cell Detection

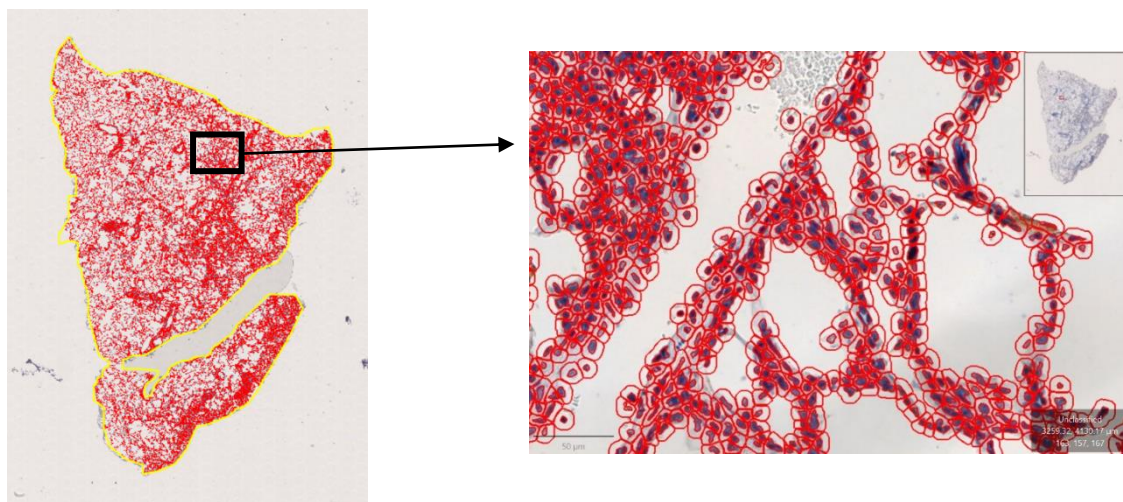


UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 3 sur 14

Une fenêtre pour le choix des paramètres s'ouvre. Il faut choisir le type d'image sur laquelle la détection va être réalisée. Différents paramètres peuvent être modifiés comme l'aire minimale des noyaux que le logiciel va détecter. Une fois les paramètres jugés satisfaisants, cliquer sur Run.



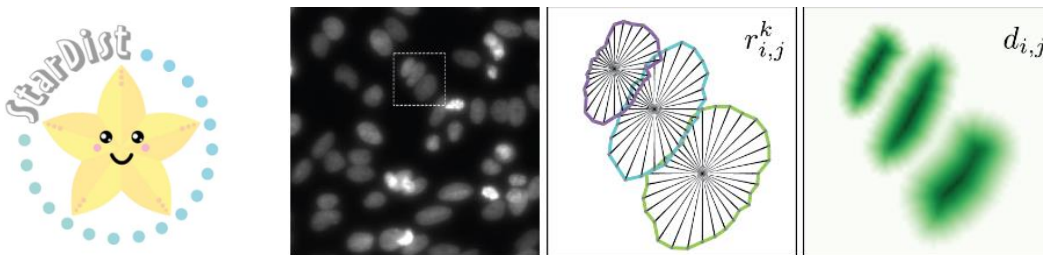
L'image analysée est divisée en plusieurs zones par le logiciel. Cette opération peut prendre quelques minutes selon la taille de l'échantillon et la densité cellulaire. Une fois terminée, les cellules et leurs noyaux présents sur la zone d'analyse sont délimités en rouge



UPSP APCSe	<h1>Mode opératoire</h1>	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 4 sur 14

1.b) Détection cellulaire à l'aide de l'extension *Stardist*

Cette méthode nécessite le téléchargement et l'installation préalable de l'extension Stardist : <https://github.com/qupath/qupath-extension-stardist> (Schmidt et al. 2018) . Il s'agit d'un algorithme de détection d'objets 2D et 3D de forme convexe à étoilée. L'approche générale de cette méthode consiste, pour un objet/une cellule donnée, en une prédiction des distances séparant le centre de l'objet aux bords de celui-ci selon des calculs de probabilité. Cela permet, pour des objets en 2D dans cet exemple, de réaliser une approximation de la forme de l'objet.



Une fois l'extension téléchargée, il est possible d'importer puis d'utiliser différents scripts permettant la détection nucléaire. Nous utilisons ici un exemple valable pour des images en Fluorescence.

```
nucleusDetection_fluo - Bloc-notes
Fichier Edition Format Affichage Aide
import qupath.ext.stardist.Stardist2D
import qupath.lib.images.servers.ColorTransforms
import qupath.imagej.gui.ImageJMacroRunner

min_nuclei_area = 3

// Specify the model directory (you will need to change this!)
def pathInput = buildFilePath(PROJECT_BASE_DIR)
def pathModel = pathInput + "/script/stardist_model_1_channel.pb"

def stardist_segmentation = Stardist2D
    .builder(pathModel)
    .preprocess( // Apply normalization, calculating values across the whole image
        Stardist2D.imageNormalizationBuilder()
            .maxDimension(4096) // Figure out how much to downsample large images to make sure the width & height are <= this value
            .percentiles(1, 99.8) // Calculate image percentiles to use for normalization
            .build()
    )
    .tileSize(4096) // If your GPU can take it, make larger tiles to process fewer of them. Useful for Omnipose
    .threshold(0.25) // Prediction threshold
    .pixelSize(0.4) // Resolution for detection
    .channels(0)
    .cellExpansion(5.0) // Approximate cells based upon nucleus expansion
    .cellConstrainScale(1.5) // Constrain cell expansion using nucleus size
    .measureShape() // Add shape measurements
    .measureIntensity() // Add cell measurements (in all compartments)
    .build()

def imageData = getCurrentImageData()
def hierarchy = imageData.getHierarchy()
def annotations = hierarchy.getAnnotationObjects()

// Run detection for the selected objects
stardist_segmentation.detectObjects(imageData, annotations)
stardist_segmentation.close()

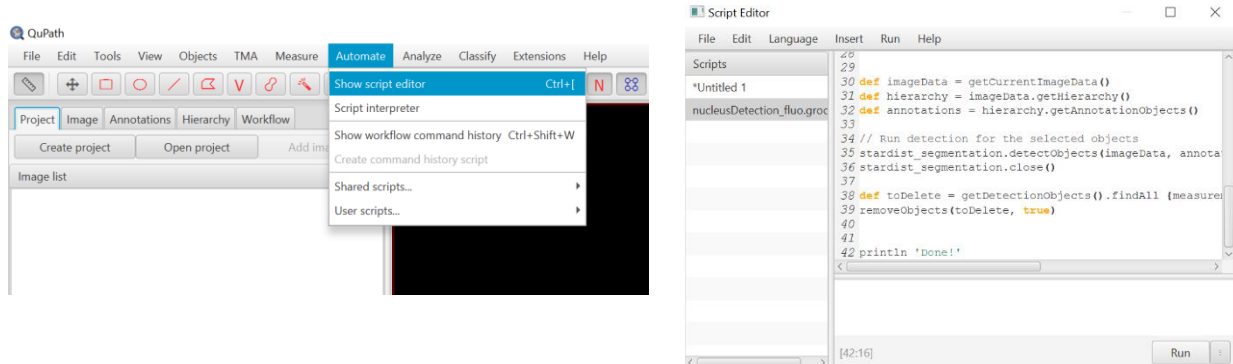
def toDelete = getDetectionObjects().findAll {measurement(it, 'Nucleus: Area μm^2') < min_nuclei_area}
removeObjects(toDelete, true)

println 'Done!'
```

UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 5 sur 14

Choisir Automate – Show Script Editor – récupérer le script souhaité dans File – Open – Choisir le script.

Démarrer l'exécution du script en cliquant sur *Run*.



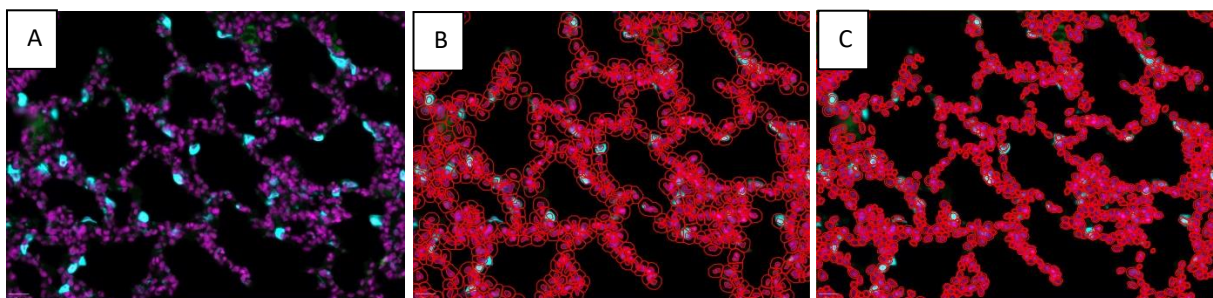
Les cellules sont alors détectées.

1.c) Quelle méthode choisir ?

Les 2 méthodes présentées permettent de détecter les cellules sur une lame. La finalité est identique mais il existe des différences motivant le choix de l'une ou l'autre selon le contexte et l'analyse souhaitée.

	Outil <i>Cell Detection</i>	Outil <i>Stardist</i>
Durée de traitement	Rapide	Longue
Niveau de difficulté d'utilisation	Facile	Moyen à difficile
Matériel nécessaire	Accessible pour tout ordinateur	Nécessite un ordinateur plus puissant
Précision de la détection	Modérée	Elevée

Pour illustrer ces éléments, voici une zone d'échantillon (A) analysée avec l'outil *Cell Detection* (B) puis avec *Stardist* (C).



UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 6 sur 14

On peut voir que la détection réalisée avec l'outil Stardist est plus fine. Les contours cellulaires sont mieux appréhendés et plus précis qu'avec l'analyse Cell Detection. A titre d'exemple, il a fallu 1 seconde pour analyser cet échantillon avec l'outil Cell Detection contre 30 secondes avec le Stardist.

Le choix de l'outil de détection dépend donc de l'utilisateur, du temps disponible pour les analyses, du matériel à disposition et de la précision souhaitée.

- Trier les cellules détectées

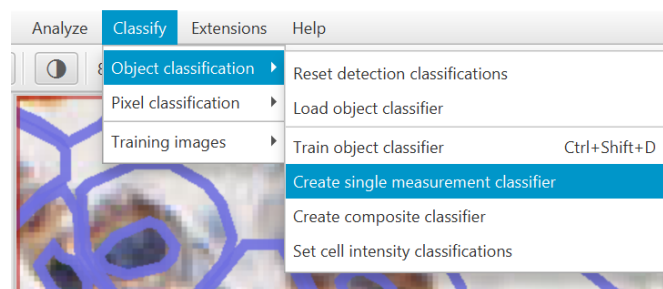
Le logiciel QuPath permet de déterminer le pourcentage de cellules présentant certaines caractéristiques que l'utilisateur peut définir. Par exemple, dans le cas du marquage de cellules, il est possible de déterminer le nombre de cellules marquées/colorées.

Il existe deux méthodes pour cela, une assez simple et l'autre plus complexe.

- 1) Méthode simple et rapide, à utiliser pour des marqueurs simples et de bonne intensité

Il faut au préalable définir une échelle de classification.

Choisir Classify – Object classification – Create Single Measurement Classifier

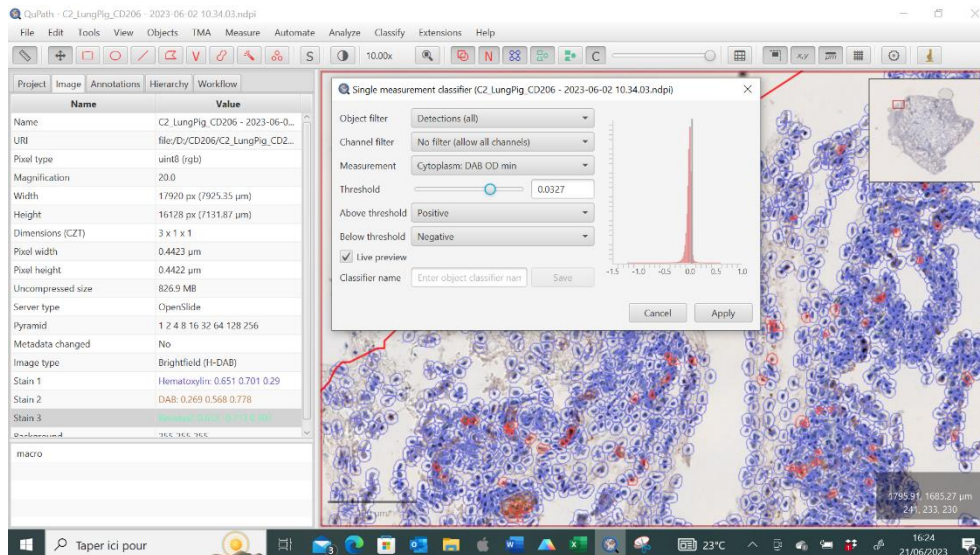


Il faut ensuite définir les paramètres de classification souhaités :

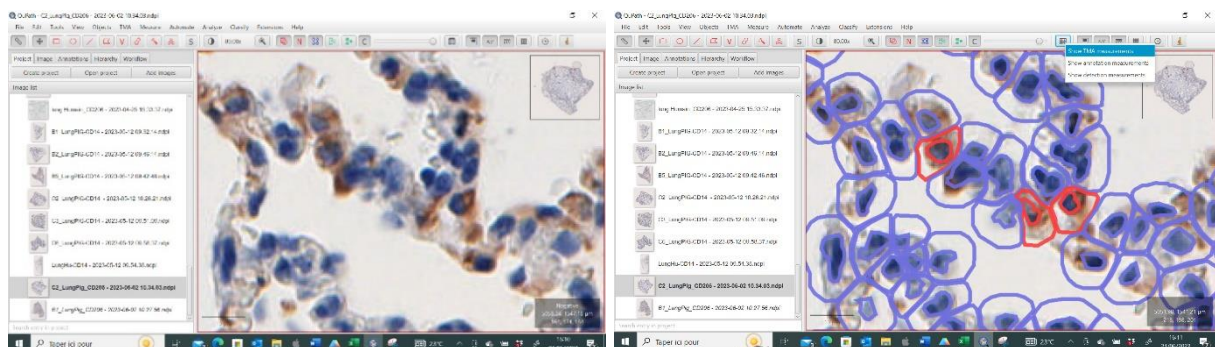
-Threshold : définir la teinte de référence (correspond par exemple à la teinte des cellules marquées positivement).


-Above et Below Threshold : définir comme Positif les cellules de teinte supérieure au Threshold défini, Négatif si inférieur


UPSP APCSe	<h1>Mode opératoire</h1>	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
<h2>Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées</h2>		Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 7 sur 14



On a alors en rouge les cellules marquées considérées comme positives et en violet les cellules non marquées considérées comme négatives.

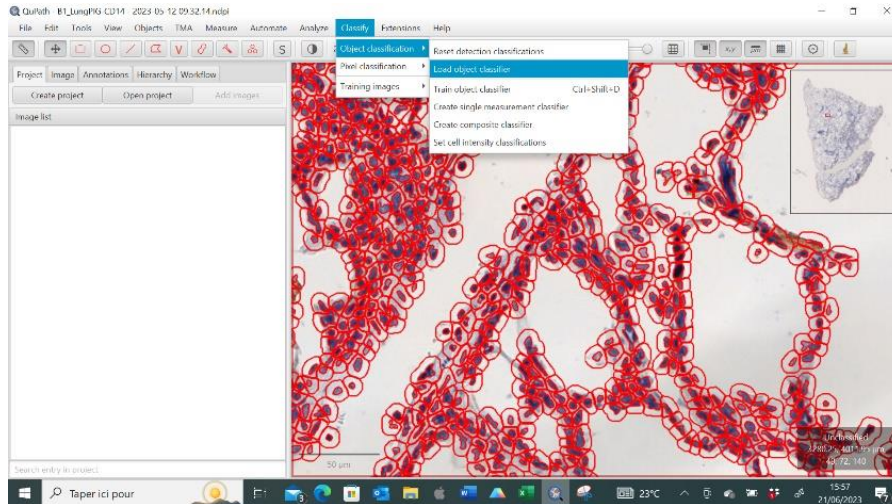


De nombreuses informations concernant les cellules marquées sont disponibles dans l'onglet *Show Measurements Table* 

Thumbnail	Image	Name	Class	Parent	ROI	Centroid X μm	Centroid Y μm	Num Detections	Num Negative	Num Positive	Positive %	Num Positiv
	C2_LungPig_CD206 - 2023-06-02 10.34.03.ndpi	PathAnnotationObject		Image	Polygon	4018.4	3536.5	124249	121498	2751	2.214	131

Il est possible d'enregistrer les paramètres de classification pour appliquer l'analyse facilement à d'autres images. Il suffit ensuite de charger l'*Object Classifier* souhaité.

UPSP APCSe	<h1>Mode opératoire</h1>	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 8 sur 14

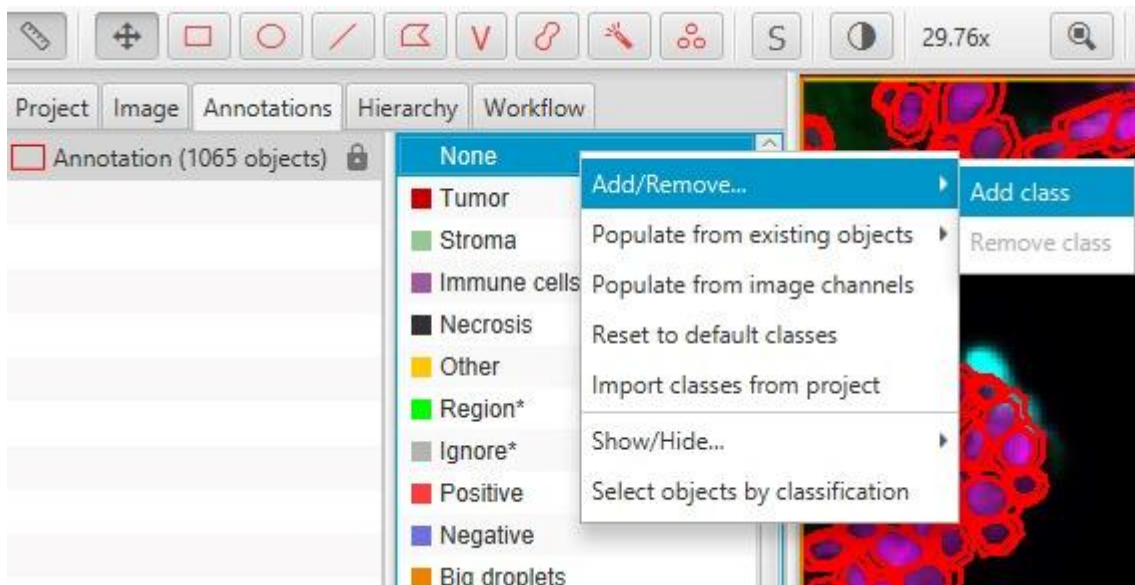


1) Méthode complexe et plus sensible pour des marquages moins précis

Le principe de cette méthode est que nous allons « entraîner » un Classifieur à reconnaître les cellules positives et négatives en lui donnant des exemples.

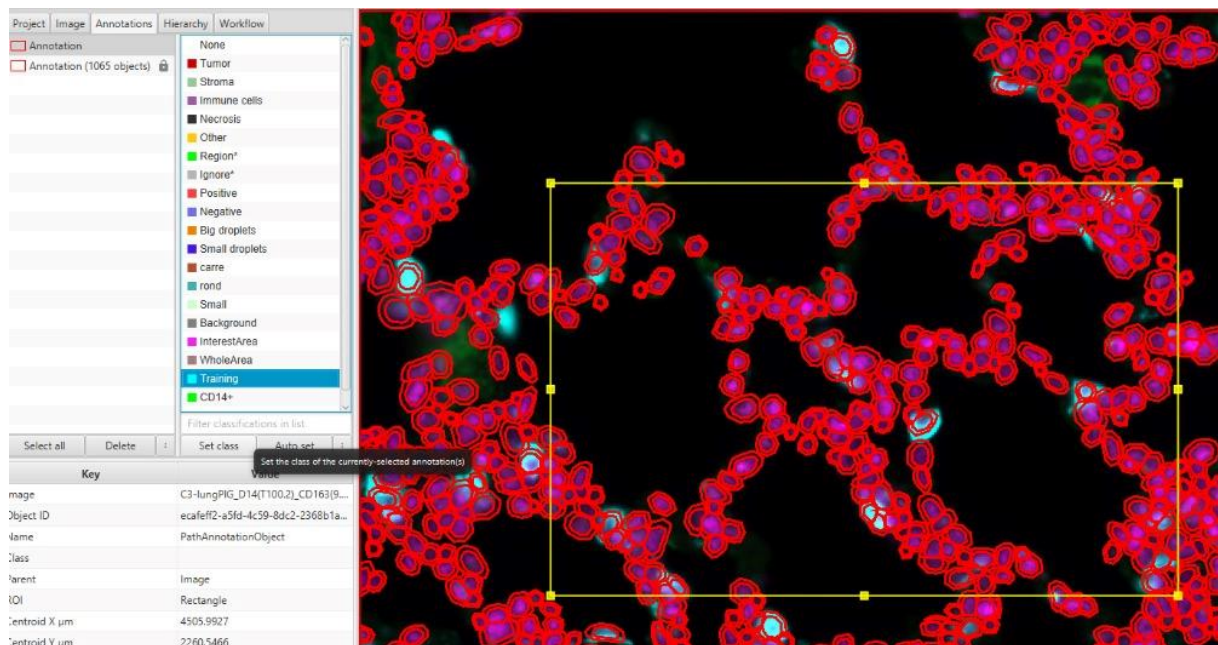
Il faut d'abord créer une image en compilant plusieurs zones intéressantes provenant de différents échantillons (zones contenant des exemples représentatifs de cellules positives ou négatives).

Pour cela : il faut d'abord définir une classe *Training* dans Annotation.



UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 9 sur 14

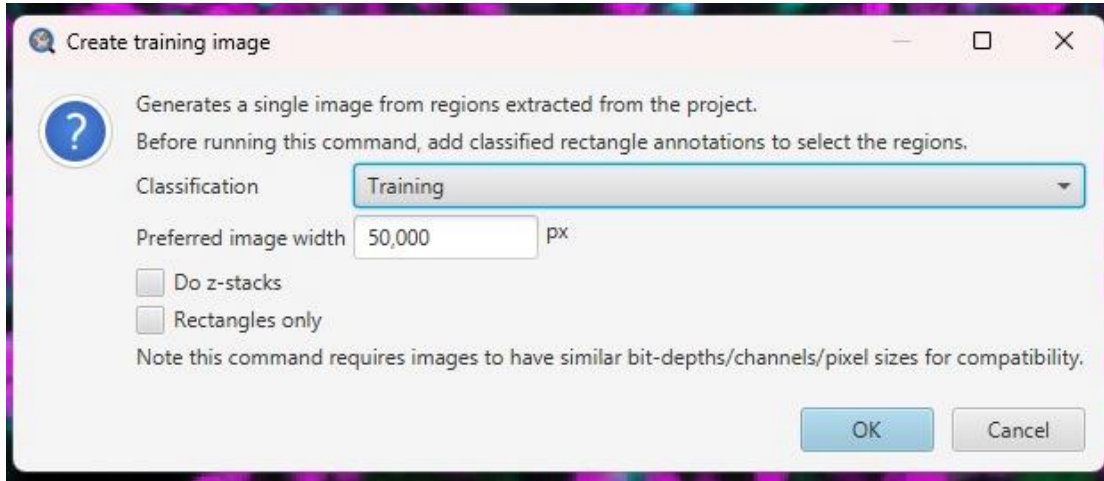
Une fois la classe définie, il faut sélectionner plusieurs zones d'intérêts (zones avec cellules marquées et non marquées) sur plusieurs échantillons. Pour cela, définir la zone d'étude de forme souhaitée puis cliquer sur *Set Class* pour que la zone soit considérée comme une zone de classe *Training*. Il est recommandé de choisir de 2 à 4 zones d'intérêts.



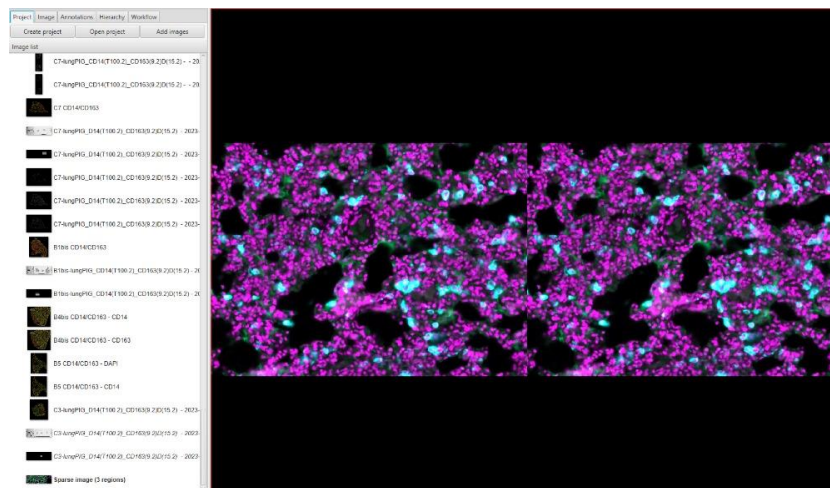
Une fois les zones détournées, choisir *Classify – Training images – Create Training Images*.

Il faut ensuite bien sélectionner la bonne classification : le logiciel va compiler les images de la classe choisie (ici *Training*) pour en créer une nouvelle.

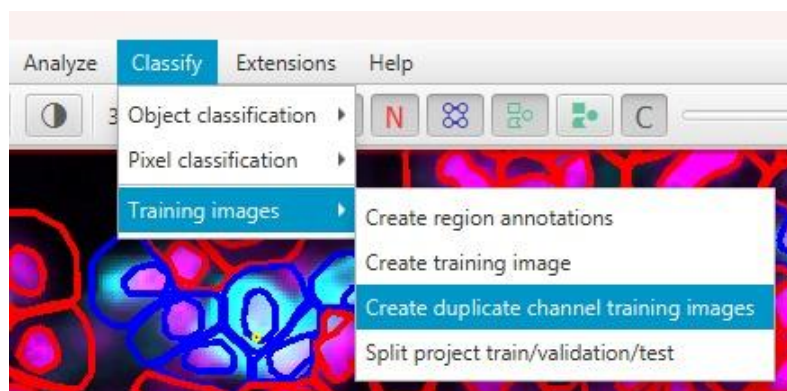
UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 10 sur 14



La *Training Image* est alors créée.

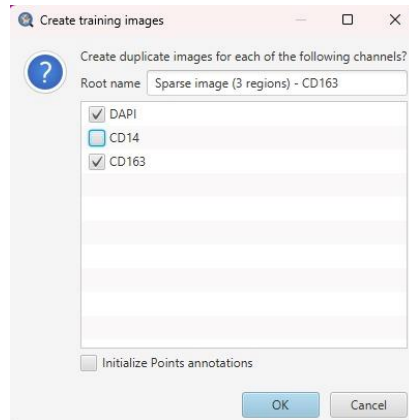


On va ensuite s'intéresser à chaque marqueur successivement. Si plusieurs marqueurs doivent être analysés, il est possible de dupliquer la *Training Image* en choisissant le canal/le marqueur affiché.



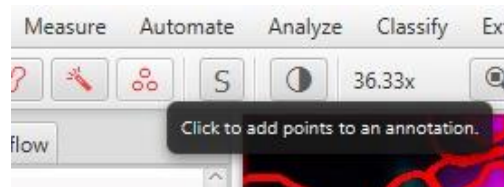
UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 11 sur 14

Il faut choisir les canaux que l'on souhaite garder dans l'image dupliquée (il est recommandé de faire une image pour chaque marqueur étudié).

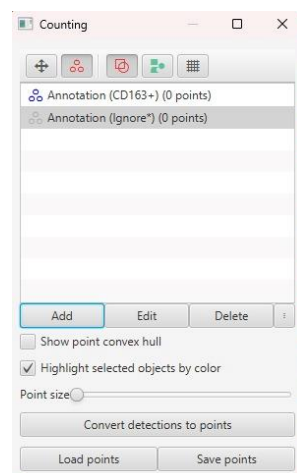


On va ensuite s'intéresser à un seul marqueur, ici le CD163. Il faut créer 2 nouvelles classes (même principe que pour la création de la classe *Training*) : une classe CD163+ et une classe *Ignore* (classe déjà définie dans le logiciel).

Ouvrir ensuite le menu *Annotation*. Ajouter avec *Add* les classes préalablement créées (CD163+ et *Ignore*).

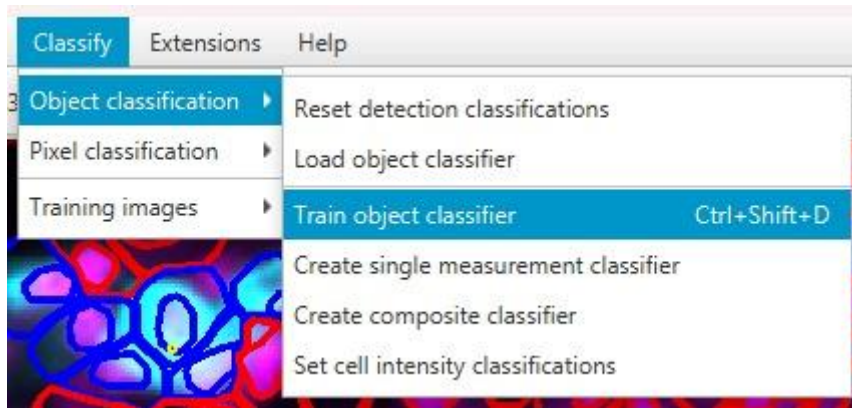


Add – cliquer sur l'annotation créée – choisir la classe d'annotation CD163+ préalablement créée - *Set Class*.

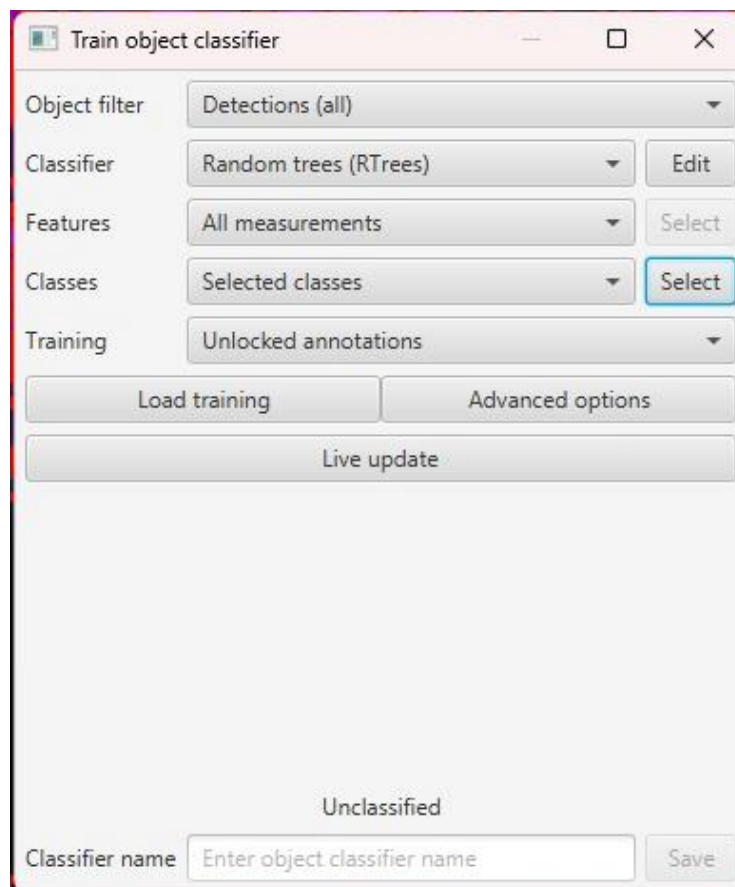


UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 12 sur 14

Nous allons ensuite créer l'*Object Classifier*.

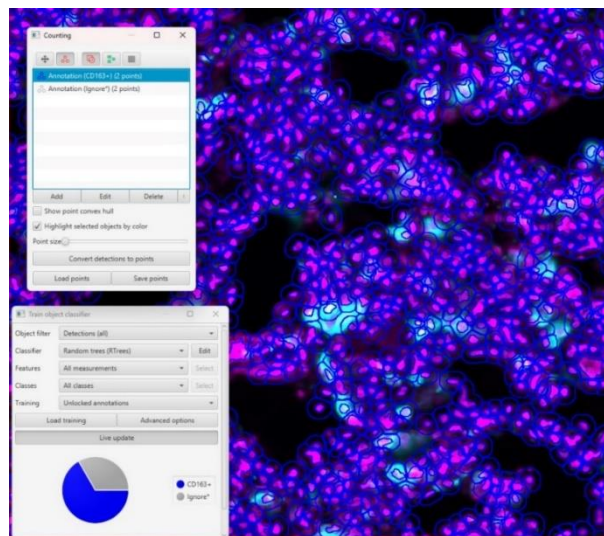


Le menu de l'*Object Classifier* s'ouvre. Il est possible de choisir les classes à utiliser (ici CD163+ et *Ignore*).

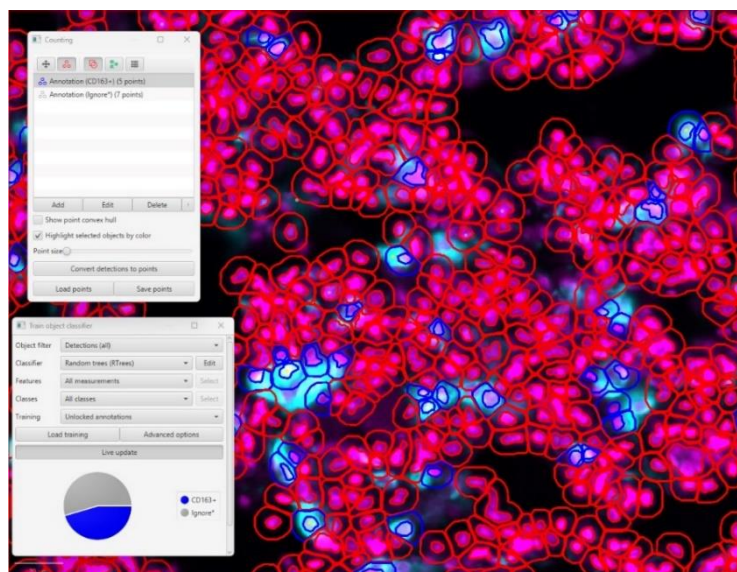


UPSP APCSe	<h1>Mode opératoire</h1>	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 13 sur 14

Le principe maintenant est d'entraîner l'*Object Classifier* à reconnaître les cellules marquées CD163 et les cellules non marquées. Pour cela, il faut trouver des exemples de cellules CD163+ et les annoter avec la classe d'annotation CD163+. Idem pour les cellules non marquées à annoter avec la classe *Ignore*. Il est recommandé de trouver des exemples flagrants de cellules positives et négatives mais également des exemples moins flagrants (cellule marquée mais d'intensité moins importante, cellule négative mais avec un fond de marquage). Il faut que le nombre d'exemples positifs et négatifs soit équilibré. Le *Live Update* permet de suivre l'avancée des annotations.

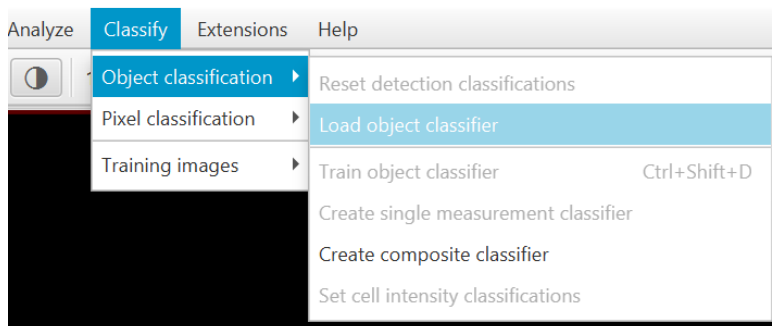


Au fur et à mesure de l'ajout d'exemples de cellules positives et négatives, la reconnaissance des cellules marquées est de plus en plus précise. Lorsque la reconnaissance des cellules est jugée satisfaisante, l'*Object Classifier* est prêt à être utilisé. On peut lui donner un nom et l'enregistrer.

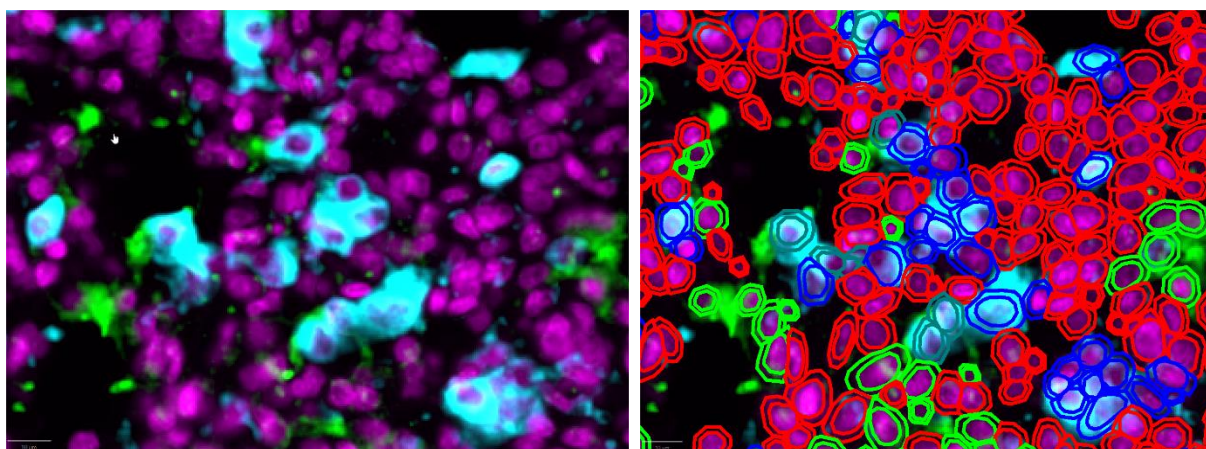


UPSP APCSe	Mode opératoire	Code du document : BIOMOL - QUAL - 010
	Protocole d'utilisation du logiciel QuPath – Détection Cellulaire et détermination du nombre de cellules marquées	Version : 1 Date : 07 juin 2023 Page 14 sur 14

Il est alors possible de traiter les différentes images avec notre *Object Classifier*.



Ce protocole peut être reproduit pour chaque marqueur étudié. Il est ensuite possible d'appliquer plusieurs *Object Classifier* sur une même image pour déterminer le nombre de cellules marquées pour chaque marqueur et également le nombre de cellules co-marquées.



Pour exemple, nous avons ici entraîné le logiciel à reconnaître les cellules CD163+ en bleu foncé, CD14+ en vert clair, DAPI (ou négatif) en rouge. Les cellules marquées en vert foncé correspondent aux cellules comarquées CD14+/CD163+.

	Rédacteur	Approbateur
Nom :	Eloïse Besson	Tatiana VICTONI
Date :	07 juin 2022	31 août 2023

Annexe 4 : Figures supplémentaires

Figure S1

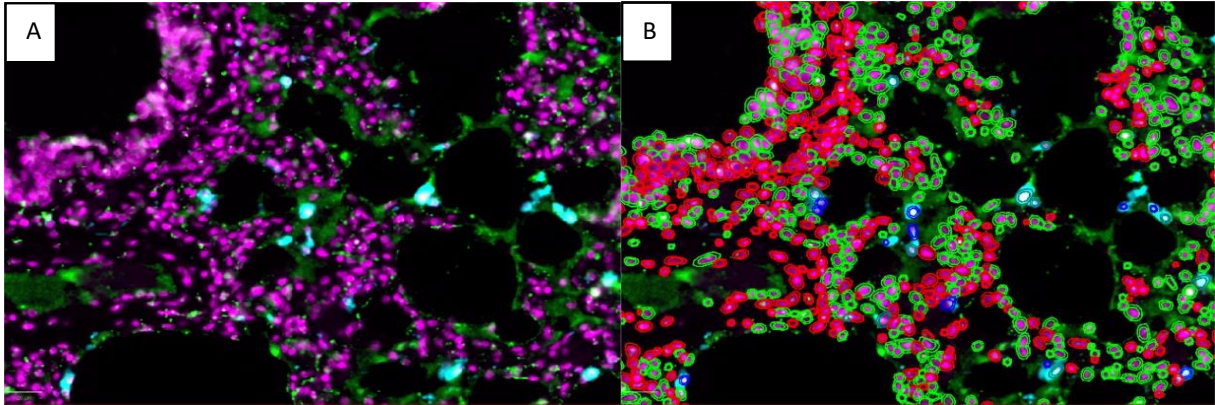


Figure S1 : Exemple de zone d'échantillon marquée à l'anticorps anti-CD14 et présentant un important bruit de fond. Le tissu présenté provient d'un porc 2h30 après instillation de *Pseudomonas aeruginosa*. (A) Les flèches indiquent des cellules marquées par l'anticorps anti-CD14. (B) Les cellules entourées en vert clair correspondent aux cellules considérées par le logiciel comme CD14⁺. On voit que ce nombre est trop important par rapport au nombre réel de cellules CD14⁺. Source : Eloïse Besson ; Images obtenues sur le logiciel QuPath

Figure S2

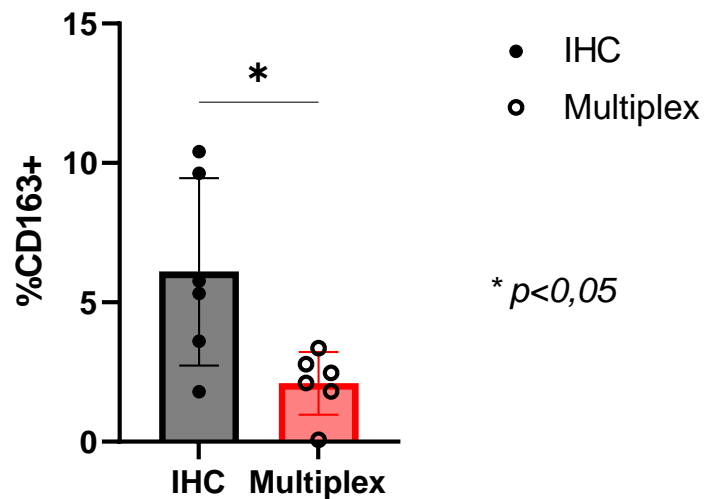


Figure S2 : Pourcentage de cellules marquées CD163 sur les échantillons de tissus pulmonaires porcins selon le protocole de marquage. Le pourcentage de cellules marquées est significativement supérieur lors de l'utilisation du protocole IHC par rapport au protocole Multiplex

Figure S3

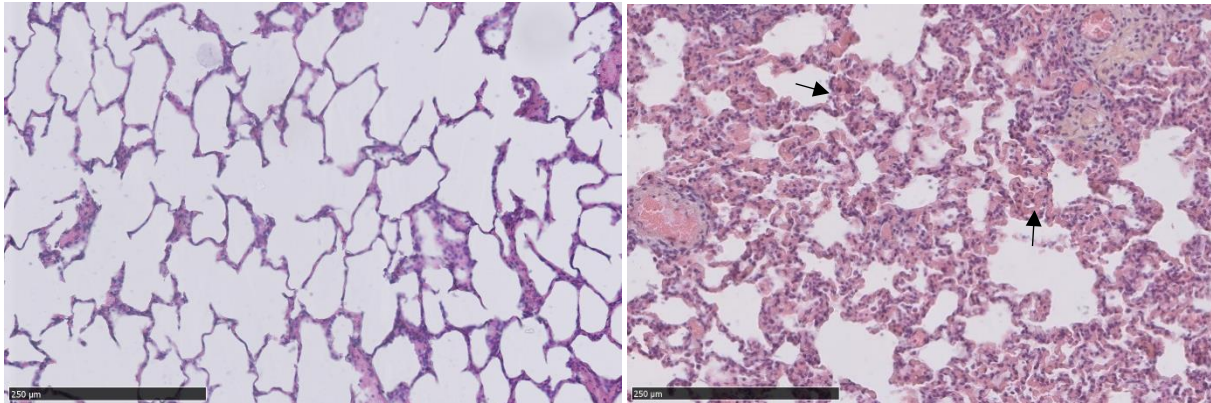


Figure S3 : Parenchyme pulmonaire de porc coloré au HES. Les tissus présentés proviennent de deux porcs du groupe basal. Les flèches indiquent des parois alvéolaires pulmonaires épaissies et présentant un motif inflammatoire. Barre d'échelle : 250µm. Source : Eloïse Besson ; NDP.view, Objectif x40

LE PORC COMME MODELE PRECLINIQUE IMMUNOLOGIQUE. L'EVALUATION DU POTENTIEL IMMUNOLOGIQUE DANS LE SEPSIS

Auteur

BESSON Eloïse

Résumé

La souris est aujourd'hui le modèle animal le plus utilisé par les chercheurs. Néanmoins, la transposition des thérapies mises au point chez la souris vers des essais cliniques chez l'Homme se traduit par de nombreux échecs, soulignant l'intérêt de recourir à des modèles animaux complémentaires. Les macrophages régulent la réponse immunitaire par leur polarisation vers différents phénotypes fonctionnels (pro et anti-inflammatoires), et le dysfonctionnement de cette réponse immunitaire est l'un des mécanismes qui sous-tend l'apparition et le développement du sepsis. Le profil et les caractéristiques des macrophages tissulaires pulmonaires sont bien connus chez l'Homme et le rongeur, mais peu connus chez le porc.

Ce travail de thèse vise à mettre en évidence l'utilisation du porc comme modèle préclinique immunologique en démontrant l'existence de sous-populations de macrophages pulmonaires. Dans la première partie de ce manuscrit, bibliographique, nous avons réalisé un état des lieux de l'utilisation des animaux dans la recherche. Puis, nous avons présenté les similitudes anatomiques, physiologiques et immunologiques existantes entre l'Homme et le porc. Dans la seconde, expérimentale, nous avons évalué les différents marqueurs des macrophages dans un modèle de choc septique porcin.

Nous avons observé que le marquage avec les anticorps anti-CD68 pour les macrophages M1 semble être non spécifique. En revanche, l'utilisation des anticorps anti-C206 et anti-CD163 permet de réaliser un marquage spécifique. Nous avons enfin pu mettre en évidence une augmentation du nombre de macrophages marqués CD163 chez le porc soumis au choc septique. Ceci nous laisse supposer que le CD163 semble être un marqueur des macrophages M1 pro-inflammatoires et le CD206 un marqueur des macrophages M2 résidents. Les résultats de nos travaux confirment l'existence de différents phénotypes de macrophages dans les tissus pulmonaires porcins.

Mots-clés

Modèle pré-clinique, Sepsis, Inflammation, Porc, Biomarqueurs

Jury

Président du jury : Pr **ALLAOUCHICHE Bernard**
Directrice de thèse : Dr **VICTONI Tatiana**
2ème assesseur : Dr **PEROZ Carole**