

MEMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ETUDE SPECIALISEES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions réglementaires en vigueur tient lieu de
THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Intérêt éthique et scientifique des modèles cellulaires dans l'étude de la relation hôte-
pathogène : exemple de l'infection à *Bordetella pertussis*, agent de la coqueluche**

Soutenue publiquement le 07/03/2022, par
Monsieur KHITER Fethi

Membres du jury :

Président :

CARNOY Christophe, PU Université de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

Directeur de thèse :

MIELCAREK Nathalie, DR2 INSERM, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

Assesseurs :

ROUANET-VIDAL Carine, CR Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

WOLOWCZUK Isabelle, DR2 CNRS, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

BROCHOT Etienne, MCU-PH Université de Picardie Jules Vernes

BLONDIAUX Nicolas, MCU-PH Université de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

 	LISTE GEREE	LG/FAC/001
FACULTE DE PHARMACIE	Enseignants et Enseignants-chercheurs 2021-2022	Version 2.0 Applicable au 02/01/2022
Document transversal		

REDACTION	VERIFICATION	APPROBATION
Audrey Hennebelle Assistante de direction	Cyrille Porta Responsable des Services	Delphine Allorge Doyen

Université de Lille

Président
Premier Vice-président
Vice-présidente Formation
Vice-président Recherche
Vice-présidente Réseaux internationaux et européens
Vice-président Ressources humaines
Directrice Générale des Services

Régis BORDET
Etienne PEYRAT
Christel BEAUCOURT
Olivier COLOT
Kathleen O'CONNOR
Jérôme FONCEL
Marie-Dominique SAVINA

UFR3S

Doyen
Premier Vice-Doyen
Vice-Doyen Recherche
Vice-Doyen Finances et Patrimoine
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires
Vice-Doyen RH, SI et Qualité
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie
Vice-Doyen Territoires-Partenariats
Vice-Doyenne Vie de Campus
Vice-Doyen International et Communication
Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX
Guillaume PENEL
Éric BOULANGER
Damien CUNY
Sébastien D'HARANCY
Hervé HUBERT
Caroline LANIER
Thomas MORGENROTH
Claire PINÇON
Vincent SOBANSKI
Dorian QUINZAIN

Faculté de Pharmacie

Doyen
Premier Assesseur et Assesseur en charge des études
Assesseur aux Ressources et Personnels
Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement
Assesseur à la Vie de la Faculté
Responsable des Services
Représentant étudiant

Delphine ALLORGE
Benjamin BERTIN
Stéphanie DELBAERE
Anne GARAT
Emmanuelle LIPKA
Cyrille PORTA
Honoré GUISE

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques	87
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques	87

M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BLONDIAUX	Nicolas	Bactériologie - Virologie	82
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique	85
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	85
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie	87
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87

M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie	87
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86

M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques	85

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	GEORGE	Fanny	Bactériologie - Virologie / Immunologie	87
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale	87

M.	RUEZ	Richard	Hématologie	87
M.	SAIED	Tarak	Biophysique - RMN	85
M.	SIEROCKI	Pierre	Chimie bioinorganique	85

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

*« Sois toujours fier de qui tu es, sois toujours fier de ce que tu fais.
Et surtout, sois toujours fier d'aimer. Viva la vida, Hombre ! »*

Remerciements :

Je tenais tout d'abord à remercier mes deux encadrantes, Nathalie et Carine. Merci à toutes les deux de prendre le temps de me former et de me préparer à la suite. Je pense que je pars de très loin, mais grâce à vous, je sais que je peux espérer aller encore plus loin. On croise les doigts pour la grande thèse !

Je tenais ensuite à remercier l'ensemble de mon laboratoire. Cela passe par Sophie, Kamel, Laura, Manon, Manue, les 2 Steph... et bien d'autres ! Le plus bel atout de ce laboratoire est que chacun a sa façon de faire de la science et d'exprimer sa créativité et son humanité.

J'ai aussi une petite pensée pour mes amis, sans qui je ne ferais pas grand-chose :

Kévin, Maxence, Aurélien, mes bons vieux potes du Lycée ! Le temps passe, on ne se voit pas tout le temps, mais on arrive toujours à faire une pause et on sera toujours là les uns pour les autres.

Quentin P, Thomas P, Anas, Valentin, Simon, Pauline, Gatien... mes compagnons de la route de la fac' et de maintenant ! J'ai été vraiment content de croiser votre route, car pour certains, on s'est serré les coudes pour les examens et les concours, pour d'autres car on se marre bien, tout simplement !

Esther, Kari, Cyrine, Laura, Kamel, Aless, Quentin... Mes co-thésardes, mon post-doc et leurs amours, chacun de vous me montre les bons côtés de la thèse de sciences.

Clément, Théo, Mathias, Lionel, des confrères sur qui l'on peut toujours compter.

Enfin, je remercie ma Famille. Comme je l'ai dit plus haut, je pars de loin, mais tout le chemin réalisé n'aurait pas été possible sans vous.

Table des matières

I) INTRODUCTION	1
A) L'expérimentation animale dans la recherche biomédicale	1
B) La règle des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner »	2
II) <i>BORDETELLA PERTUSSIS</i>, AGENT DE LA COQUELUCHE.....	7
A) Rôle des macrophages alvéolaires dans l'infection à <i>B. pertussis</i>	8
B) Objectifs de la thèse.....	9
III) MATERIEL ET METHODES.....	10
IV) RESULTATS	14
A) Réponse des cellules THP-1 après infection par <i>B. pertussis</i>	14
A.1 Survie intracellulaire de <i>B. pertussis</i> dans les THP-1 différenciées en macrophages :.....	15
A.2 Réponse cytokinique des THP-1 infectées par <i>B. pertussis</i> :	16
A.3 Conclusion sur l'utilisation du modèle THP-1 :.....	17
B) Le modèle de macrophages MPI.....	18
B.1 Production de TNF par les MPIs infectées avec <i>B. pertussis</i> :	18
B.2 Conclusion et perspectives du modèle MPI :	23
B.3 Infection de macrophages alvéolaires primaires murins avec <i>B. pertussis</i> :	24
V) DISCUSSION.....	26
VI) ANNEXES.....	29
VI) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	30

I) Introduction

Un des éléments fondamentaux de la Science est son rapport à la société : celle-ci se doit de toujours être utile au Vivant et respectueuse de celui-ci. A ce titre, elle répond à des questions et des besoins majeurs tels que la compréhension du monde qui nous entoure ou encore le combat contre les maladies humaines. Ceci nécessite de modéliser des événements précis dans un contexte donné et implique dans certains domaines l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

A) L'expérimentation animale dans la recherche biomédicale

La recherche biomédicale est celle qui s'intéresse à la santé humaine et animale et dont l'objectif est d'améliorer la connaissance des mécanismes physiologiques et physiopathologiques afin de développer de nouveaux outils (diagnostics, vaccins, thérapies) ou d'améliorer ceux existants pour combattre une maladie. Dans cette optique, les chercheurs utilisent couramment des animaux afin de répondre aux questions posées (Figure 1).

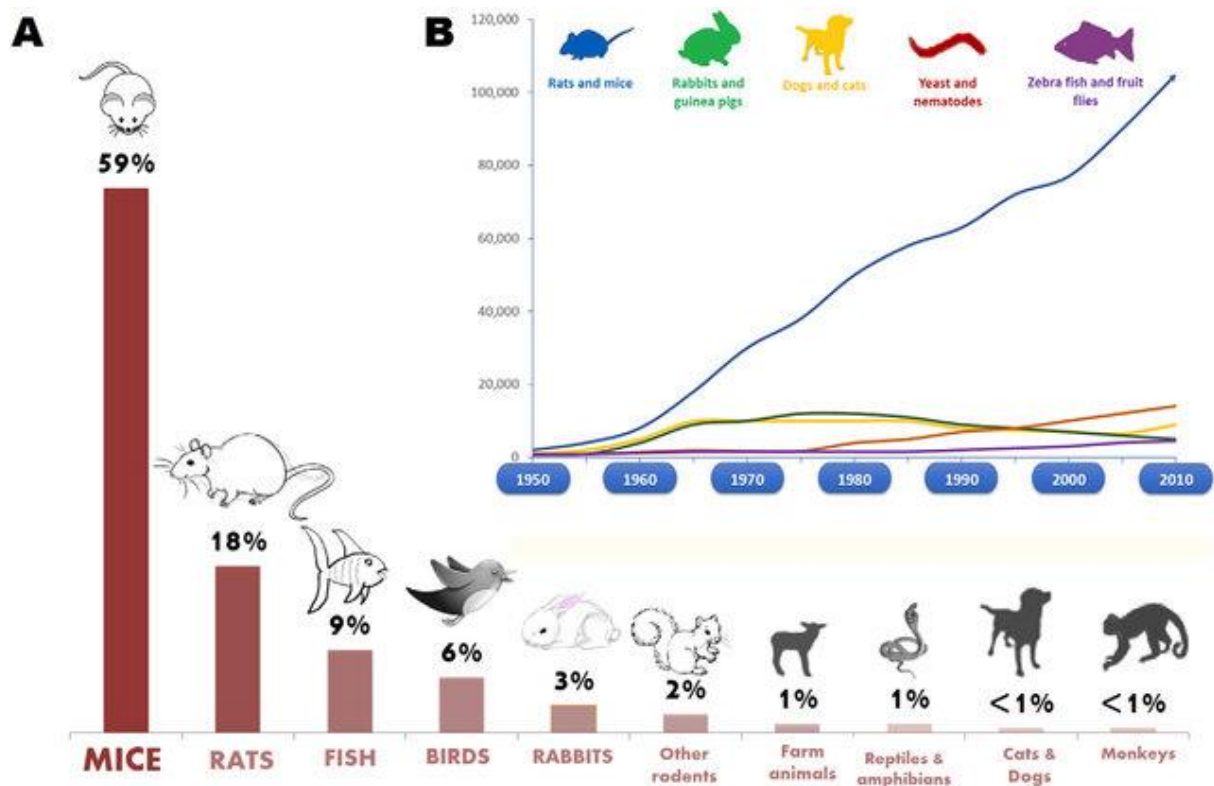


Figure 1. Représentation des modèles animaux utilisés en recherche. (A) Proportion d'animaux utilisés en recherche ou pour des objectifs scientifiques. (B) Animaux cités dans les papiers de recherche biomédicale de 1950 à 2010. D'après Dutta et al, 2016.

Taylor et Alvarez ont estimé qu'en 2015, les 3 premiers pays utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques dans le monde étaient la Chine (> 20 millions d'animaux), le Japon (> 15 millions) et les Etats-Unis (> 14,5 millions) (Taylor et Alvarez, 2020).

En France, le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESRI) a quant à lui relevé l'utilisation de plus de 1,8 millions d'animaux en 2019, majoritairement des rongeurs (77%) mais également des poissons (12%) et des poulets (4%).

La raison principale de cette utilisation importante d'animaux en recherche biomédicale est qu'ils permettent de modéliser des réponses biologiques complexes dans des contextes pathologiques et thérapeutiques divers tels que les maladies infectieuses, métaboliques, les cancers, l'évaluation de nouveaux vaccins et traitements etc. Néanmoins, cette modélisation oblige la plupart du temps le chercheur à induire la maladie chez ces animaux ce qui soulève des questions éthiques.

Dans une démarche d'amélioration du bien-être animal, une réglementation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques a été établie. Celle-ci suit notamment un principe fondamental qui est la règle des 3R, initialement introduite avec « Les Principes de la technique expérimentale humaine » par W. M.S Russel et R. L. Burch en 1959.

B) La règle des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner »

B.1 Réglementation en France et en Europe

La règle des 3R « Remplacer, Réduire, Raffiner » représente la règle éthique appliquée à l'expérimentation animale et a 3 objectifs : Remplacer le modèle animal quand cela est possible, réduire l'utilisation du nombre d'animaux, et raffiner la méthodologie utilisée.

Elle a été introduite dans la réglementation Européenne dès 1986 avec la convention Européenne STE 123 mise en place au sein de la Communauté Economique Européenne (CEE). L'objectif était d'harmoniser les pratiques existantes relatives à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. La règle des 3R a été mise en application à travers la directive 86/609/CEE. Cette directive a persisté avec l'apparition de l'Union Européenne (UE) le 1^{er} Novembre 1993 et a ensuite été abrogée et remplacée en 2010 par la directive 2010/63/UE, qui définit de façon plus complète

mais également plus stricte les conditions d'utilisation des animaux à des fins scientifiques.

Celle-ci s'est traduite en France par le décret D. n°2013-118 du 1^{er} Février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Plusieurs notions essentielles à l'expérimentation animale y sont tout d'abord définies, telles que le respect de l'animal, l'importance de son bien-être et la nécessité d'éviter toute souffrance inutile.

Le décret précise les espèces qui peuvent être utilisées à des fins scientifiques. Il détaille également les conditions d'hébergement et d'entretien des animaux ainsi que les conditions de mise à mort. Il instaure la nécessité pour les établissements de recherche de posséder un agrément les autorisant à recourir à l'expérimentation animale. Enfin il impose des exigences de formation du personnel et une obligation d'inspection des établissements agréés. A l'échelle du chercheur le décret D. n°2013-118 du 1^{er} Février 2013 lui impose une évaluation de chaque projet par un comité d'éthique. Ces comités d'éthique sont seules habilités à délivrer les autorisations de projets sur animaux et répondent à des critères spécifiques définis par le décret D. n°2013-118. Parmi eux sont inclus la « compétence pluridisciplinaire de ses membres », l'obligation de « garantir le respect à la fois de la charte nationale portant sur l'éthique en expérimentation animale », mais aussi des « principes relatifs à l'évaluation de l'éthique ». Ces comités s'assurent que le projet soit justifié d'un point de vue scientifique ou éducatif, que ses objectifs justifient l'utilisation d'animaux et qu'il soit conçu dans le respect de l'animal, de l'environnement et de la règle des 3R. Les projets sur animaux soumis pour autorisation doivent donc détailler les procédures expérimentales utilisées et les mesures mises en œuvre pour éviter la douleur, la souffrance ou l'angoisse ainsi que tout dommage durable à l'animal.

L'ensemble de ces mesures permettent une application de la règle des 3R et incitent les chercheurs à développer et utiliser des alternatives au modèle animal.

B.2 Les Alternatives au modèle animal

Dans cette optique, différentes approches *in vitro* et *ex vivo* ont été développées, telles que l'utilisation de cultures de cellules primaires, de lignées cellulaires, ou plus récemment d'organoïdes (Kim et al, 2020) et d'Organs-on-chips (Low et al, 2020).

Les cultures de cellules primaires extraites du vivant ont été historiquement l'une des premières alternatives au modèle animal. Elles peuvent être maintenues et/ou se multiplier dans des milieux standardisés contenant des facteurs de croissance et/ou de différenciation et sont ensuite utilisées dans des expériences dites *ex-vivo*. Malgré tout, ces cellules finissent inéluctablement par rentrer dans un état de sénescence et de mort ce qui en limite leur utilisation. De plus, il existe une variabilité liée au processus d'extraction pouvant affecter la reproductibilité des résultats.

Les lignées cellulaires correspondent quant à elles à des clones d'une cellule issue du vivant et pouvant être transformée ou immortalisée. Ce sont les modèles les plus utilisés après les approches *ex vivo* car ils permettent d'obtenir très facilement des quantités illimitées de cellules issues d'un même clone, ce qui en fait un modèle peu coûteux et très reproductible. Néanmoins, leur faculté à se diviser indéfiniment peut provoquer l'accumulation d'une ou plusieurs mutations au sein de la lignée, et induire un biais dans les résultats observés. Elles imposent donc une utilisation et un suivi rigoureux en limitant le nombre de passages afin d'éviter les dérives.

Il existe également des matrices cellulaires en 3D appelées organoïdes. Il s'agit de cultures de cellules souches tissulaires ou pluripotentes dans une matrice à 3 dimensions où elles s'autoorganisent (Figure 2). Bien que ces modèles nécessitent d'obtenir des cellules souches initialement extraites du vivant et un temps de croissance important afin d'obtenir une structure organisée, il s'agit de modèles moins coûteux que certains modèles animaux, faciles à manipuler, et mimant d'autres aspects des réponses biologiques (Kim et *al*, 2020).

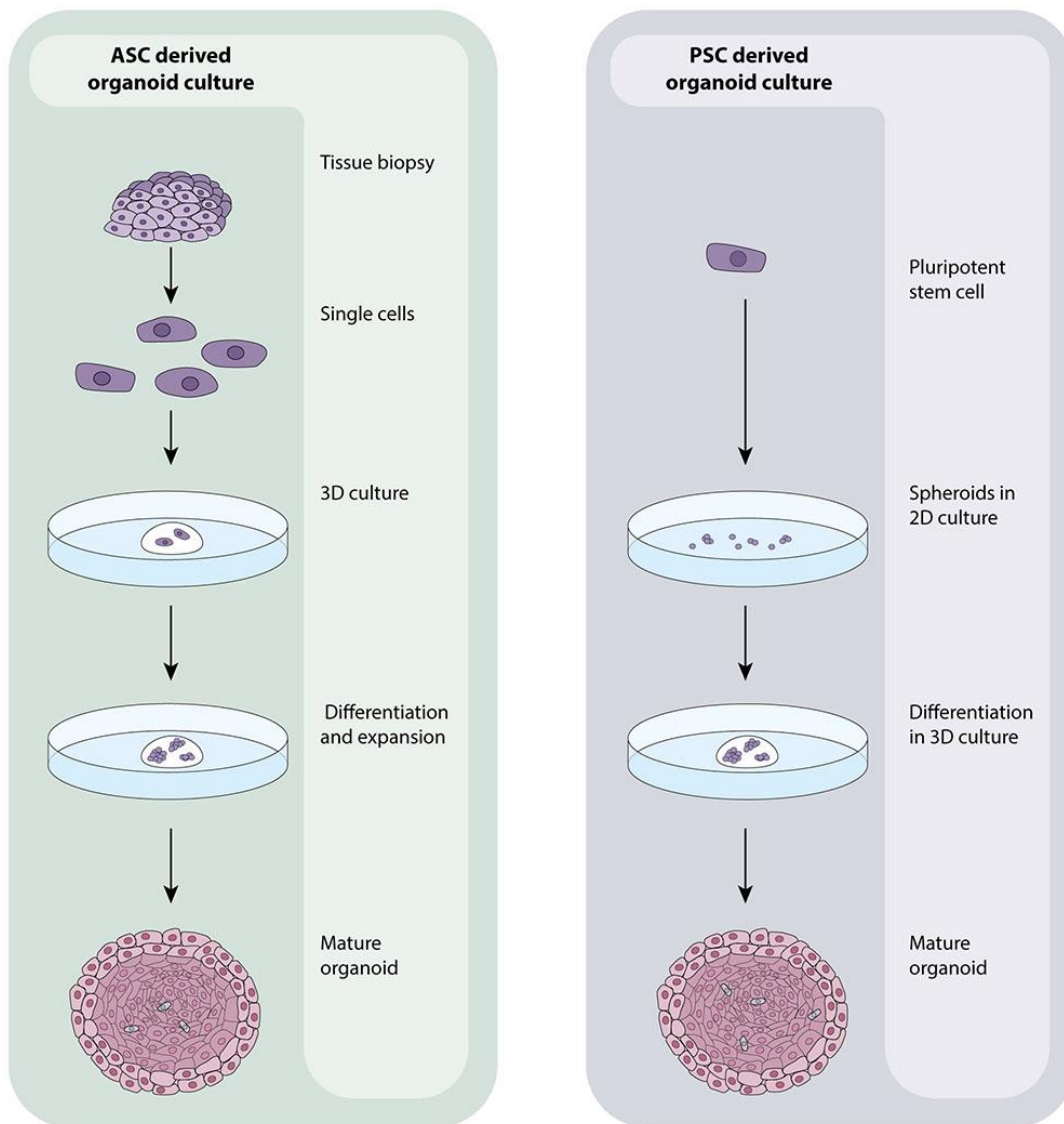


Figure 2. Schématisation des préparations d’Organoïdes issus de cellules souches de patients adultes (« Adult Stem cells (ASC) ») isolés de biopsies tissulaires ou de cellules souches pluripotentes (« Pluripotent Stem Cells (PSC) »). Après obtention de ces cellules, celles-ci sont cultivées en 3 dimensions dans des milieux de culture conditionnés et sont différenciées afin d’obtenir un organoïde mature. D’après Iakobachvili et al, 2017

Les « Organ-on-chips » ou organes sur puce en français sont des structures en 3 dimensions, organisées en chambres de culture et dans lesquelles sont cultivés plusieurs types cellulaires afin de reproduire les événements biologiques et mécaniques qui ont lieu au sein d’un organe.

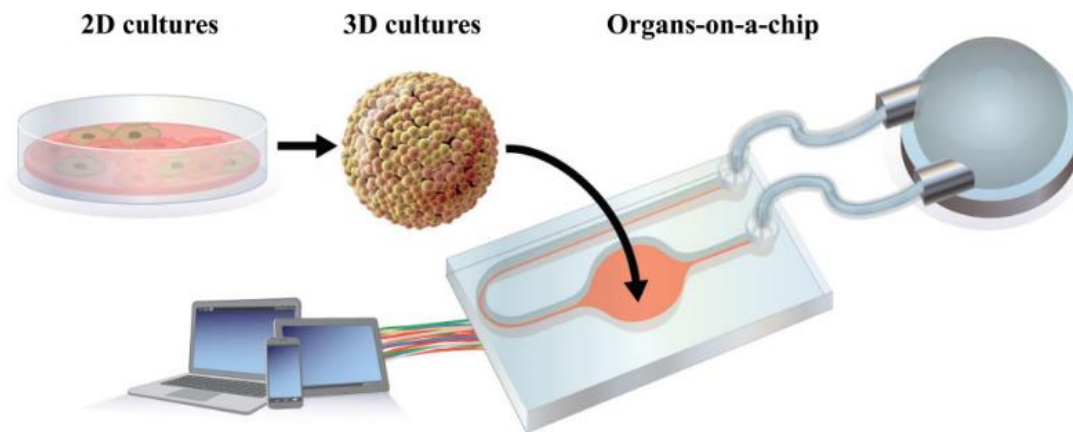


Figure 3. Schématisation des Organ-on-ships. Après culture des cellules en milieux conditionnés, celles-ci sont placés et recultivées dans des microcanaux fluidiques. L'analyse de différents paramètres tels que les phénomènes mécaniques ou l'équilibre osmotique peut être détecté, quantifié puis analysé par méthode informatique. D'après Bovard et *al*, 2017.

Les organes sur puce ont comme avantage de permettre un contrôle total sur ce qu'il se passe au sein de l'organe mimé : Il est par exemple possible d'imiter le flux hémodynamique cardiaque ou la motilité intestinale à l'aide de ce modèle (Figure 3) (Low et *al*, 2020).

Enfin, il existe des approches dites *in silico* qui consistent à modéliser une réponse de façon mathématique et à l'aide de la bio-informatique (Madden et *al*, 2020). Elles permettent par exemple de mimer des réponses biologiques parfois impossible à mettre au point sur les autres modèles, de réaliser des pré-ciblages de molécules ayant l'activité pharmacologique souhaitée, d'évaluer l'efficacité d'un candidat médicament ou vaccin pour la prévention et le traitement de maladies. Par ailleurs, il est possible d'intégrer des données issues des précédents modèles afin de le rendre plus robuste.

Ces multiples alternatives permettent ainsi de recueillir de nombreuses informations et de limiter l'utilisation d'animaux en recherche qui au final, seront utilisés pour valider les données obtenues.

Grâce à ces modèles, il est ainsi possible d'étudier l'interaction hôte-pathogène sous plusieurs angles. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'infection par *Bordetella pertussis*, bactérie responsable de la coqueluche.

II) *Bordetella pertussis*, agent de la coqueluche

Bordetella pertussis (ci-après dénommé *B. pertussis*) est un coccobacille Gram négatif et représente l'agent pathogène responsable de la coqueluche, une maladie respiratoire responsable de plus de 24 millions de cas dans le monde et plus de 160 000 décès chez les enfants de moins de 5 ans (Yeung K H T et al, 2014).

La transmission de *B. pertussis* se fait par voie interhumaine directe via des gouttelettes respiratoires transmises au moment de la toux. Lors d'une infection, la bactérie va coloniser progressivement le tractus respiratoire depuis les voies aériennes supérieures jusqu'au niveau alvéolaire, ceci à l'aide de plusieurs facteurs de virulence, notamment des adhésines telles que l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), les fimbriae de type 2 et de type 3 (FIM-2, FIM-3) et la pertactine (PRN) (Melvin et al, 2014) ainsi que des toxines comme la toxine pertussique (PTx), la toxine cytotrachéale (TCT) et l'adénylate cyclase toxine (ACT) qui sont responsables de la pathologie (Figure 4).

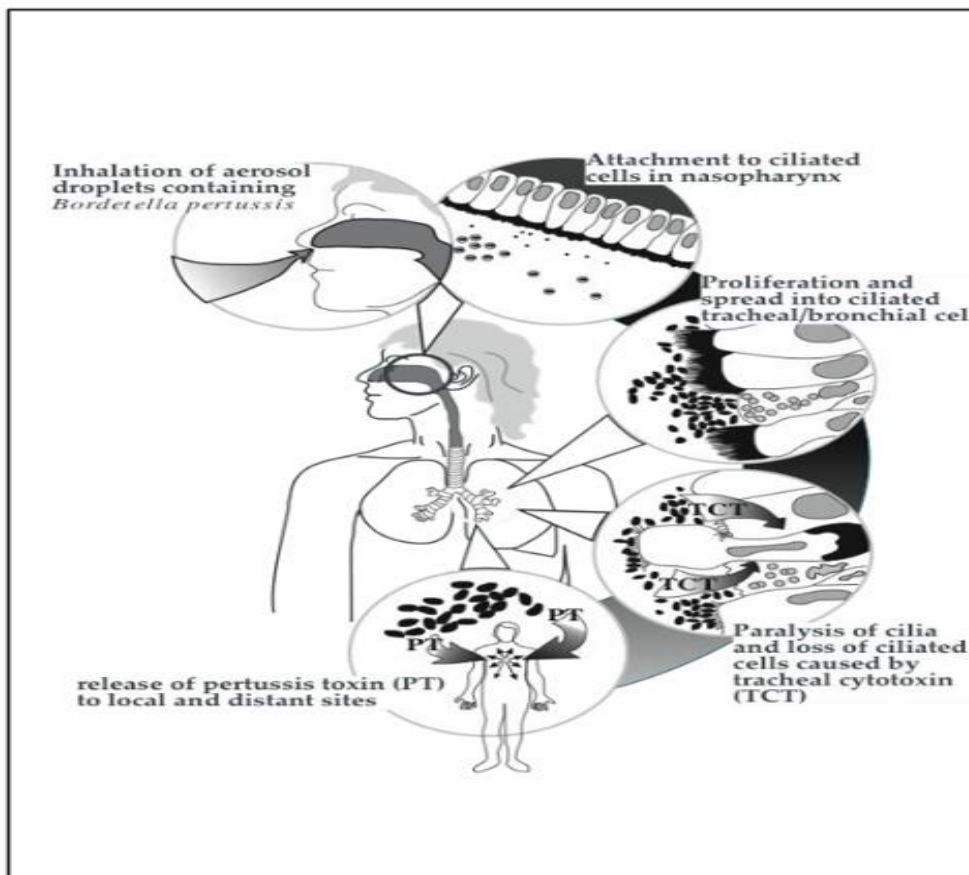


Figure 4. Infection des voies respiratoires par *B. pertussis*. L'individu est contaminé avec des gouttelettes aérosols contenant du *B. pertussis*. La bactérie va s'attacher aux cellules ciliées du nasopharynx et se propager au sein du tractus respiratoire grâce à la production de facteurs de virulence, adhésines et toxines. D'après Hewlett et al, 1997

Chez l'homme, l'infection à *B. pertussis* se manifeste cliniquement par 3 phases : i) une phase catarrhale, qui apparaît 7 à 10 jours après le premier contact et qui se caractérise par des signes peu spécifiques (fièvre modérée, toux simple, inflammation des muqueuses) et une forte contagiosité ; ii) une phase paroxysmale, définie par des quintes spécifiques de l'infection à *B. pertussis* associées à des cyanoses et des vomissements post-tussifs. Cette phase peut durer jusqu'à 1 mois. Enfin iii) une phase de convalescence qui se caractérise par des troubles respiratoires pouvant durer plusieurs semaines voire plusieurs mois. (Daniels et Sabella, 2018). Dans les formes létales d'infection à *B. pertussis* observées chez l'enfant, ces effets se caractérisent localement par une muqueuse pulmonaire endommagée avec perte des cils, une métaplasie squameuse et un infiltrat inflammatoire important conduisant à des bronchiolites et des alvéolites (Paddock et al, 2008).

A) Rôle des macrophages alvéolaires dans l'infection à *B. pertussis*

Les macrophages alvéolaires (AMs) sont des cellules sentinelles du tractus respiratoire capables de phagocyter les pathogènes et d'initier une réponse immunitaire, à travers notamment la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-6 ou l'IL-8 (Duque et Descoteaux, 2014). Lors d'une infection par *B. pertussis*, les AMs sont parmi les premières cellules qui vont interagir avec la bactérie. Chez la souris, une déplétion de ces cellules conduit à une augmentation de la charge de *B. pertussis* dans les poumons 4 jours après l'inoculation (Carbonetti et al, 2007), ce qui souligne un rôle précoce dans la protection contre la bactérie.

Certains des facteurs de virulence produits par la bactérie vont jouer un rôle important dans l'interaction avec les AMs. Ainsi, l'hémagglutinine filamenteuse (FHA), adhésine majeure produite par *B. pertussis*, est capable de se lier *in vitro* au récepteur du complément CR3 (appelé aussi CD11b ou intégrine $\alpha M\beta 2$) présent sur les macrophages (Relman et al, 1990). Parmi les toxines produites par *B. pertussis*, l'adénylate cyclase (ACT) prévient la maturation des monocytes en macrophages (Ahmad et al, 2019) et la toxine pertussique (PTX) inhibe l'apoptose des AMs *in vitro* via la voie PI3K/PKB (Wang et al, 2007).

Par ailleurs, les macrophages ont été décrits comme réservoir potentiel de *B. pertussis*. En effet, une étude réalisée à partir de lavages broncho-alvéolaires d'enfants HIV+ a montré la présence de *B. pertussis* dans des macrophages alvéolaires (Bromberg et

al, 1991). *B. pertussis* est également détectée dans les AMs 3 jours après une infection respiratoire chez la souris (Vandebriel et al, 2003). Lamberti et ses collègues (2010) ont pour leur part observé dans un modèle d'infection *in vitro* de macrophages humains THP-1 que la majorité des bactéries était tuée par les cellules infectées mais qu'un nombre réduit de ces bactéries pouvait s'échapper vers les endosomes précoces et y survivre. L'ensemble de ces données suggèrent que les macrophages et plus particulièrement les macrophages alvéolaires pourraient jouer un rôle de réservoir dans l'infection à *B. pertussis*.

B) Objectifs de la thèse

L'étude de l'interaction entre *Bordetella pertussis* et les macrophages alvéolaires est compliquée par le fait que la récupération d'AMs primaires implique l'utilisation d'un grand nombre d'animaux, le rendement de récupération étant particulièrement faible (entre 2×10^5 à 5×10^5 cellules/souris).

L'objectif de cette thèse de pharmacie est de comparer plusieurs modèles de macrophages pour l'étude des interactions avec *B. pertussis* et d'évaluer l'intérêt à la fois scientifique et éthique de ces modèles cellulaires.

III) Matériel et Méthodes

- **Souches de *B. pertussis* et milieux de culture utilisés :**

Dans le cadre de ce travail, 3 souches de *B. pertussis* ont été utilisées. Le tableau ci-joint résume les spécificités de ces souches :

	BPSM	B1917g	BPZE1
Origine	Dérivé de Tohama-I résistant à la streptomycine	Dérivé de B1917, résistant à la gentamicine	Dérivé de BPSM
Facteurs de virulence exprimés	PTx + TCT + DNT+	PTx +++ TCT + DNT +	PTx inactive TCT (<98%) DNT -
Résistance aux antibiotiques	Streptomycine (S ^R)	Gentamicine (G ^R)	Streptomycine (S ^R)
Référence	Menozzi et al, 1994	Coutte et al, non publié	Mielcarek et al, 2006

Tableau 1. Souches de *B. pertussis* utilisées dans le cadre de ce travail.

Les cultures de *B. pertussis* se font sur milieu solide Bordet-Gengou (BG ; Difco™[®]), supplémenté en sang de mouton défibriné (10%). Après ensemencement, les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 36h à 48h. Les bactéries peuvent également être cultivées dans un milieu de croissance liquide appelé milieu Stainer-Scholte (SS – composition décrite en annexe). La quantification des bactéries se fait alors par spectrophotométrie, sachant qu'une unité de densité optique (DO) à 600 nm correspond à 3.0 x 10⁹ bactéries/ml. L'ensemble de ces manipulations est réalisé dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2 (BSL-2).

Sauf si précisé, la souche B1917g est appelée B1917 dans ce document.

- **Culture des macrophages :**

Cellules THP-1 :

Les cellules THP-1 (ATCC[®]TIB-202™) sont cultivées dans un milieu de culture composé de RPMI1640 + Glutamax-I (Gibco[®]) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Eurobio[®]) décomplémenté. Les passages de cellules THP-1 sont

effectués par dilution de la culture dans du milieu frais, qui est ensuite incubée à 37°C, en présence de 5% de CO₂. Les THP-1 sont utilisées jusqu'à un maximum de 20 passages.

Cellules MPI :

Les cellules MPI (Fejer et al, 2013) nous ont été données par l'équipe du Docteur Jean-Claude Sirard (INSERM U1019, UMR9017, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, équipe BAI). Ces cellules sont cultivées dans un milieu composé de RPMI1640 + Glutamax-I (Gibco®) supplémenté avec 10% de SVF (Eurobio®) décomplémenté et 30 ng/ml de GM-CSF recombinant murin (Miltenyi®). Les passages de cellules MPI sont effectués en éliminant le surnageant de culture et en détachant le tapis cellulaire par incubation pendant 5 minutes avec du Versène Froid (Gibco®). La suspension cellulaire est ensuite centrifugée 5 min à 240 g. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire repris dans du milieu de culture frais. Les MPIs sont utilisées jusqu'à un maximum de 30 passages.

- **Isolement de macrophages alvéolaires murins primaires**

Les souris femelles utilisées pour ces expériences sont des C57BL/6 âgées de 6 semaines provenant de chez Charles River (L'abresle, France).

Les souris sont anesthésiées par administration intrapéritonéale d'Euthasol (TVM Lab®) dilué au $\frac{1}{13}$. Des lavages broncho alvéolaires (BAL) sont alors réalisés de manière à récupérer la population de macrophages alvéolaires. Brièvement un cathéter est inséré dans la trachée de l'animal puis, à l'aide d'une seringue, 800 µl de tampon de lavage (PBS SVF 2% EDTA 2mM) préalablement préchauffé à 37°C sont injectés dans les poumons. Le liquide est récupéré par aspiration. Cette étape de lavage est répétée 10 fois et les 8 ml de BAL d'un même animal sont poolés.

La suspension est centrifugée à 300 g, 5 min à 4°C. Une lyse des érythrocytes résiduels est réalisée à l'aide de 500 µl de tampon ACK (Gibco®). Les culots cellulaires issus de 10 souris sont ensuite rassemblés et repris dans 2 ml de RPMI SVF 10%. Après comptage les cellules, reprises en RPMI, SVF 10%, pyruvate 1 mM (Gibco®), Pénicilline 100 U/ml /Streptomycine 100 µg/ml (Gibco®), sont distribuées en plaque 96 puits à raison de 5 x 10⁵ cellules/puits 24h avant de réaliser l'infection par *B. pertussis*.

- **Infection cellulaire par *B. pertussis* :**

Pour les expériences d'infection, les THP-1 sont déposées en plaque 6 puits (CytoOne®) à raison de 2×10^6 cellules/puits et différenciées en macrophages par addition de 50 ng/ml de Phorbol 12-Myristate 13- Acétate (Sigma-Aldrich®) durant 36 à 72h. Les MPI sont déposées également en plaque 6 puits, à la même concentration, 24h avant infection pour permettre aux cellules d'adhérer au fond du puits.

Les macrophages alvéolaires primaires sont déposés en plaques 96 puits immédiatement après la récupération des BALs à raison de 2×10^5 cellules/puits. L'infection est réalisée 24h après.

Après lavage et reprise des cellules dans le milieu de culture approprié dépourvu d'antibiotique, les macrophages sont infectés par *B. pertussis* à une MOI (ou Multiplicité de l'Infection) de 10, de 50 ou de 100 selon les expériences, pendant 30 minutes ou 1h. Deux lavages successifs sont ensuite réalisés avant traitement pendant 1h avec de la Polymyxine B (Euromedex®) à 100µg/ml afin d'éliminer les bactéries extracellulaires résiduelles. Après incubation, l'antibiotique est éliminé et du milieu frais est alors ajouté. A différents temps post-infection, les cellules sont lavées en PBS puis lysées par 1 ml de Saponine 0.1% diluée en PBS, afin de récupérer les bactéries intracellulaires. Des dilutions sériées de ce lysat sont ensuite étalées sur milieu Bordet-Gengou. Ces boîtes de Petri sont alors incubées à 37°C pendant 7 jours puis un comptage des Colonies Formant Unités (CFU) est effectué.

- **Dosage des cytokines sécrétées dans le surnageant par les cellules infectées par *B. pertussis* :**

24h après la fin de l'infection, le surnageant de culture des cellules infectées est récupéré afin de doser les cytokines libérées. Dans le cas des cellules Thp1, le TNF, l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, le GM-CSF ont été quantifiés par Luminex (kit « human ultrasensitive Magnetic 10-Plex Panel », Thermofisher®). Pour les cellules MPI et les macrophages alvéolaires primaires, le TNF a été dosé par ELISA (kit « Mouse TNF ELISA SET II », BD Biosciences®).

- **Inhibition de la phagocytose :**

L'inhibition de la phagocytose des cellules a été réalisée par incubation avec 10 μ M de Cytochalasine D (Sigma-Aldrich[®]) pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite lavées avant de réaliser l'infection.

- **Evaluation de la viabilité cellulaire :**

24h après infection, la viabilité cellulaire est évaluée à l'aide d'un test MTT (kit « Cell Prolifération Kit I (Test MTT) », Roche[®]), qui est une méthode de dosage colorimétrique basé sur la bioréduction des sels de Tétrazolium (MTT) en Formazan par les cellules vivantes. Brièvement, les cellules sont incubées pendant 4h avec des sels de Tétrazolium (0,5 mg/ml) afin de former des cristaux de Formazan, dont la concentration est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Les cristaux de Formazan sont ensuite dissous par incubation sur la nuit avec une solution de solubilisation. Une mesure de la densité optique (DO) est alors effectuée à 570 nm. Les résultats sont exprimés en rapportant la DO des cellules infectées à celles des cellules non infectées et traduits en pourcentage (%).

- **Analyse statistique des données :**

L'analyse statistique des données a été effectuée sur le logiciel GraphPad Prism (version 9) et Rstudio[®]. Les tests statistiques utilisés sont le test de Mann-Whitney (GraphPadPrism[®]) le Two-Way Ordinary ANOVA (GraphPadPrism[®]) et l'ART-ANOVA (Rstudio). Tous ces tests ont été réalisés avec une p-value bilatérale, $p \leq 0.05$ est considéré comme statistiquement significative. * correspond à une p-value ≤ 0.05 , ** correspond à une p-value ≤ 0.01 .

- **Déclaration éthique:**

Les animaux utilisés dans cette étude ont été hébergés et manipulés selon les directives du Ministère Français de la Recherche et les directives éthiques en vigueur (C59-350009 ; Institut Pasteur de Lille, Lille, France). Les expériences ont été conduites par du personnel qualifié et agréé.

IV) Résultats

A) Réponse des cellules THP-1 après infection par *B. pertussis*

Les THP-1 proviennent d'un patient atteint d'une leucémie aigüe monocytique et ont des propriétés semblables aux monocytes humains, exprimant par exemple le CD13 et le CD14 (Forrester et al, 2018). Ils peuvent être différenciés en macrophages après incubation avec un agent chimique, le Phorbol 12-Myristate-13-Acétate (ou PMA).

Les THP-1 sont couramment utilisés dans l'étude des interactions macrophages-pathogènes et nous avons donc choisi d'avoir recours à ce modèle pour évaluer la survie intracellulaire de *B. pertussis* au cours du temps et quantifier la production de cytokines par les cellules en réponse à l'infection. Le protocole d'infection est schématisé ci-dessous (Figure 5) :

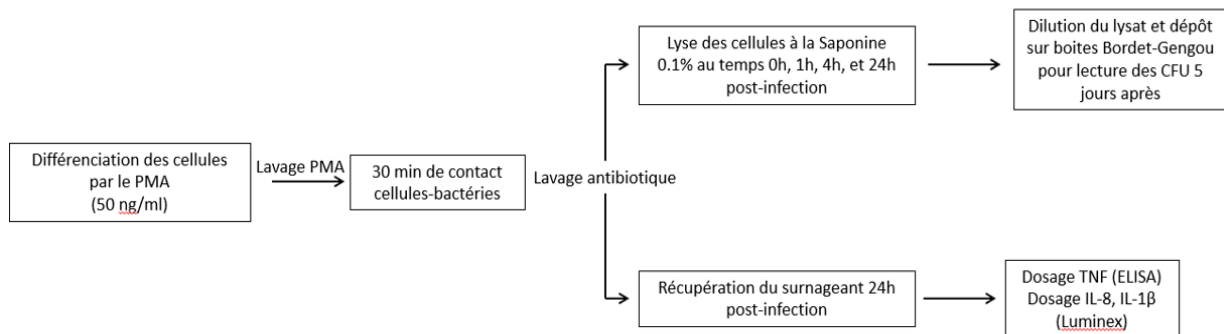


Figure 5. Protocoles d'infection des cellules THP-1. Après différenciation des cellules en macrophages à l'aide du PMA, les cellules sont lavées puis infectées avec *B. pertussis*. L'infection est arrêtée par des lavages et l'ajout d'un antibiotique pendant 1h. Les cellules sont ensuite lysées avec de la Saponine 0,1% et le lysat cellulaire est étalé sur boîte pour lecture des Unités Formant Colonies (UFC ou « Colony Forming Units » (CFU) en anglais) 5 jours après. 24h après la fin de l'infection, le surnageant de culture est récupéré et la quantification des cytokines est effectuée par la méthode Luminex.

Les THP-1 préalablement différenciés en macrophages sous l'action du PMA sont infectées pendant 30 minutes avec 3 souches de *B. pertussis* :

- la souche virulente BPSM est résistante à la streptomycine et est couramment utilisée dans mon laboratoire d'accueil. Elle est dérivée de Tohama-I issu d'un isolat clinique datant des années 50 (Antoine et Loch, 1990).
- la souche virulente B1917 est représentative des souches de *B. pertussis* circulant actuellement. B1917 produit une plus grande quantité de toxine pertussique que Tohama-I (Mooi et al, 2009).

- la souche atténuée BPZE1, dérivée de BPSM. BPZE1 exprime une PTx enzymatiquement inactive, libère une quantité résiduelle de toxine cytotrachéale (TCT) et ne produit plus de toxine dermonécrotique (DNT) (Mielcarek et al, 2006).

Après 30 min de contact (T0), les bactéries extracellulaires sont éliminées par lavages et incubation d'une heure avec la polymyxine B.

A.1 Survie intracellulaire de *B. pertussis* dans les THP-1 différenciées en macrophages :

Après infection réalisée à une MOI 100, les cellules sont lysées à différents temps avec de la saponine pour récupérer les bactéries intracellulaires. Des dilutions sériées du lysat cellulaire sont ensuite étalées sur un milieu solide Bordet-Gengou de manière à dénombrer les unités formant colonies (UFC ou « Colony Forming Units ») (CFU) en anglais). Les résultats sont exprimés en pourcentage en rapportant le nombre de bactéries retrouvées au cours du temps au nombre de bactéries internalisées à T0 (Figure 6).

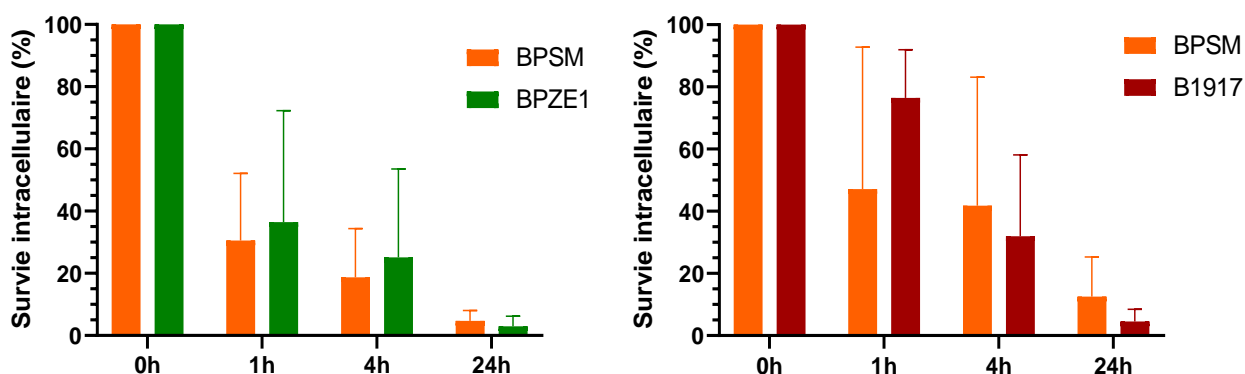


Figure 6. Survie intracellulaire de *B. pertussis* dans les cellules THP-1. Les cellules sont infectées avec les souches virulentes BPSM ou B1917 ou la souche atténuée BPZE1. A différents temps après infection, les cellules sont lysées et les lysats sont étalés sur boîte BG. Les comptages des colonies bactériennes sont réalisés 5 jours plus tard. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux bactéries initialement retrouvées à T0. L'expérience a été réalisée 2 fois, en triplicats techniques.

Ces résultats montrent une clairance rapide des bactéries avec plus de 80% des bactéries intracellulaires éliminées par les macrophages THP-1 24h après le début de l'infection. Aucune différence significative n'est observée entre les 3 souches de *B. pertussis*, suggérant que dans ces conditions la virulence de la souche n'influe pas sur la survie intracellulaire de la bactérie.

A.2 Réponse cytokinique des THP-1 infectées par *B. pertussis* :

Afin d'analyser l'impact de la virulence bactérienne sur la réponse cytokinique des cellules, des THP-1 sont infectées par *B. pertussis* en utilisant 3 MOI (10, 50 et 100) différentes. La production de cytokines est mesurée dans le surnageant de culture, 24h après la fin de l'infection par Luminex® (Figure 7).

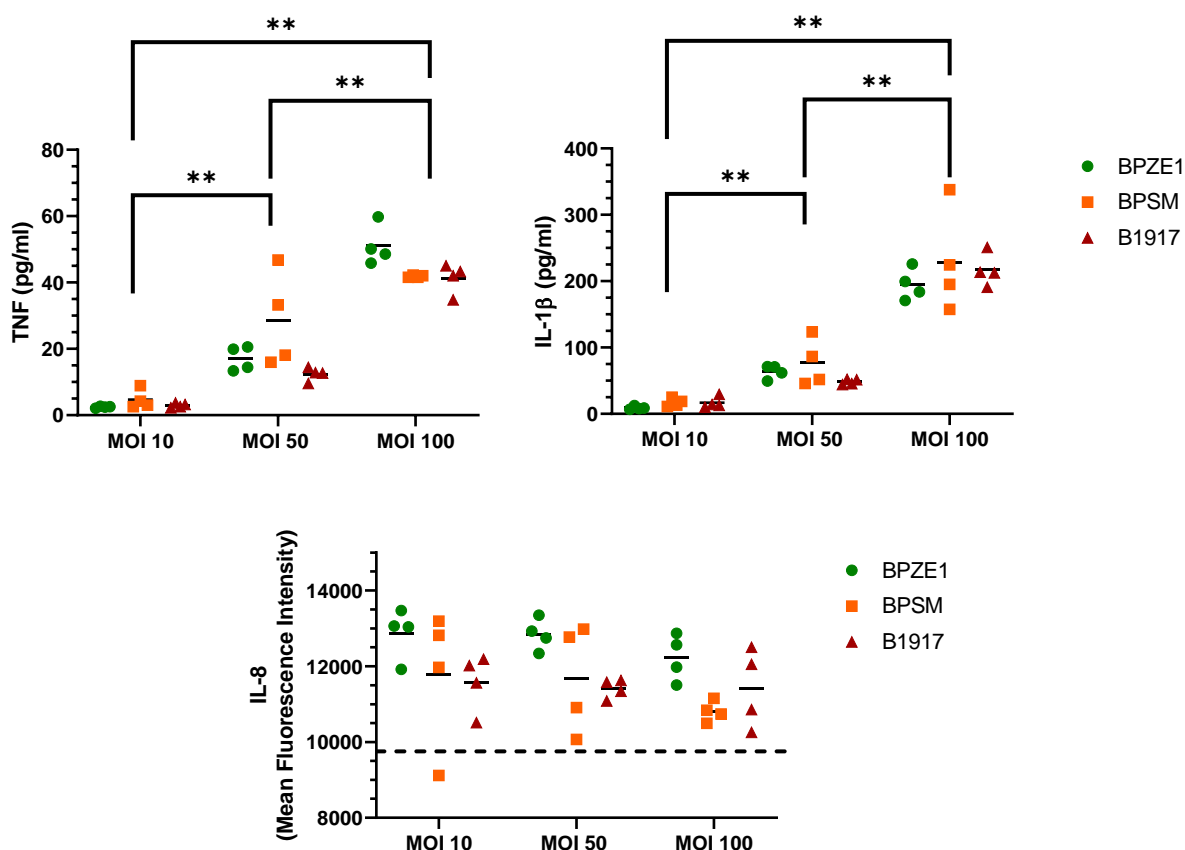


Figure 7. Production de cytokines par les cellules THP-1 24h après infection avec *B. pertussis*. Les cellules sont infectées avec les souches virulentes BPSM ou B1917 ou la souche atténuée BPZE1. Le dosage des cytokines par Luminex est réalisé dans les surnageants de culture récupérés 24h après infection. Les résultats sont exprimés en pg/ml moyen. ** correspond à une p-value $\leq 0,01$. Le trait en pointillé correspond à la moyenne obtenue pour des cellules non infectées. Test statistique utilisé : Kruskal-Wallis. ** correspond à une p-value $< 0,01$.

Dans ces conditions expérimentales, seules les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 β et IL-8 sont détectées. Nous constatons que la production de TNF et de l'IL-1 β est dépendante de la MOI. Une production importante (> 640 pg/ml) d'IL8 a pu être détectée mais n'a pas pu être quantifiée précisément du fait des limites techniques de la technologie Luminex.

Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence significative entre les 3 souches, suggérant que dans ces conditions, la virulence bactérienne n'impacte pas la production de ces cytokines.

A.3 Conclusion sur l'utilisation du modèle THP-1 :

Ces premiers résultats montrent que les THP1 différenciées en macrophages sont capables d'internaliser et d'éliminer rapidement *B. pertussis*. L'infection bactérienne stimule la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 β et l'IL-8. Cette production est modulée par la quantité de bactéries infectantes. En revanche, la virulence de *B. pertussis* ne semble pas influencer la quantité et la nature des cytokines produites.

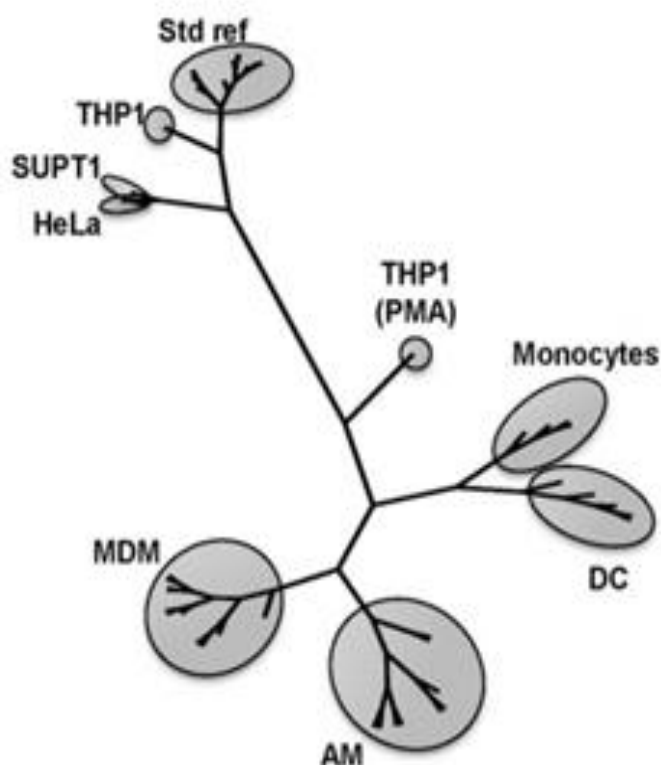


Figure 8. Arbre phylogénique basé sur les signatures transcriptomiques des monocytes, des cellules dendritiques (DC), des macrophages dérivés de monocytes (MDM), des macrophages alvéolaires (AMs) et des lignées cellulaires THP-1 (avec et sans PMA), HeLa, et SUPT1. Std ref correspond à une référence ARN standard. D'après Tomlinson et al, 2012

Bien que couramment utilisé pour étudier la pathogénèse de *B. pertussis* (Lamberti et al, 2010 ; Rivera-Millot et al, 2017), le modèle THP1 présente cependant certaines limitations. Les THP-1 correspondent à des cellules dérivées et transformées provenant d'une leucémie aiguë monocytique humaine qui acquièrent un phénotype de macrophage après incubation avec un agent chimique dans le milieu de culture. Les THP-1 expriment ainsi des signatures transcriptionnelles qui sont éloignées de certaines sous-populations de macrophages tels que les AMs ou même les macrophages dérivés de monocytes (MDM) (Figure 8).

Par ailleurs, les protocoles de différenciation des THP-1 sont très hétérogènes dans la littérature, ce qui peut induire des biais dans l'obtention et la comparaison de données, et est donc un autre élément à considérer avec leur utilisation.

J'ai donc souhaité utiliser un second modèle de macrophages pour valider les résultats obtenus avec les THP-1.

Parmi les macrophages couramment utilisés, on trouve les Raw 264.7 qui correspondent à des macrophages murins issus d'une leucémie viro-induite chez la souris. Contrairement aux cellules THP-1, celles-ci ne nécessitent pas d'étapes de différenciation. Néanmoins, tout comme les THP-1, les Raw 264.7 peuvent facilement dériver et des réponses très différentes peuvent être observées.

J'ai donc choisi d'utiliser un modèle moins utilisé mais particulièrement intéressant pour l'étude la pathogénèse de *B. pertussis*, les MPI dont les caractéristiques phénotypiques sont très proches des AM (Fejer et al. 2013 ; 2015).

B) Le modèle de macrophages MPI

Les macrophages alvéolaires ont une origine embryonnaire (Guilliams et al, 2013) et l'auto-renouvellement de ces cellules dépend de l'action du GM-CSF local (Dranoff et al, 1994). Les cellules MPI ont été développées au Max Planck Institute et correspondent à des cellules de foie fœtal de souris qui acquièrent un phénotype comparable à celui des macrophages alvéolaires après incubation avec du GM-CSF (Fejer et al, 2013). Un autre avantage des cellules MPI est que, contrairement aux macrophages dérivés de moelle osseuse ou obtenus à partir de lavages broncho-alvéolaires de souris, il est possible d'en obtenir une grande quantité (Fejer et al, 2013).

B.1 Production de TNF par les MPIs infectées avec *B. pertussis* :

J'ai dans un premier temps infecté les MPI avec différentes MOI (10, 50 et 100 bactéries/cellule) de *B. pertussis*, en utilisant le protocole décrit précédemment. Les expériences avec les THP-1 n'ayant pas montré une influence de la virulence

bactérienne sur la réponse cellulaire, nous nous sommes concentrés ici sur la souche virulente B1917 représentative des souches actuellement circulantes de *B. pertussis* (Mooi et al, 2009). 24h après la fin de l'infection, le surnageant de culture des cellules est récupéré et un dosage du TNF est effectué par ELISA (figure 9).

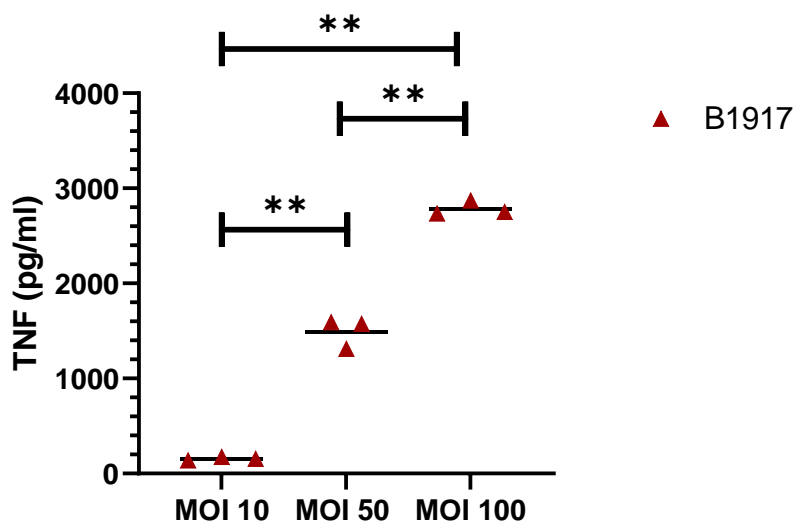


Figure 9. Production de TNF (pg/ml) par les MPI. Les MPIs sont infectées pendant 30 minutes avec la souche virulente B1917 de *B. pertussis* à différentes MOI (10, 50 et 100 bactéries/cellule), deux lavages et une incubation d'une heure en antibiotique sont effectués. 24h après infection, les surnageants sont récupérés et le TNF produit par les cellules est dosé par technique ELISA. Les résultats sont exprimés en pg/ml moyen de TNF. Test statistique utilisé : Kruskal Wallis. ** correspond à une p-value < 0,01.

Nous constatons tout d'abord que, dans de mêmes conditions expérimentales, les MPI produisent une plus grande quantité de TNF que les THP-1 (Figure 9). Comme dans le cas des THP-1, cette production est proportionnelle à la quantité de bactéries infectantes, ce qui met donc en avant un effet dose-réponse dans les deux modèles.

Nous avons ensuite analysé si la durée de contact cellules-bactéries influençait la réponse cytokinique des MPI. Pour cela les MPI ont été infectées avec B1917 pendant 30 minutes, 1h et 2h à une MOI de 10 ou 50 puis le TNF présent dans le surnageant, 24h après la fin de l'infection, a été dosé par ELISA (Figure 10).

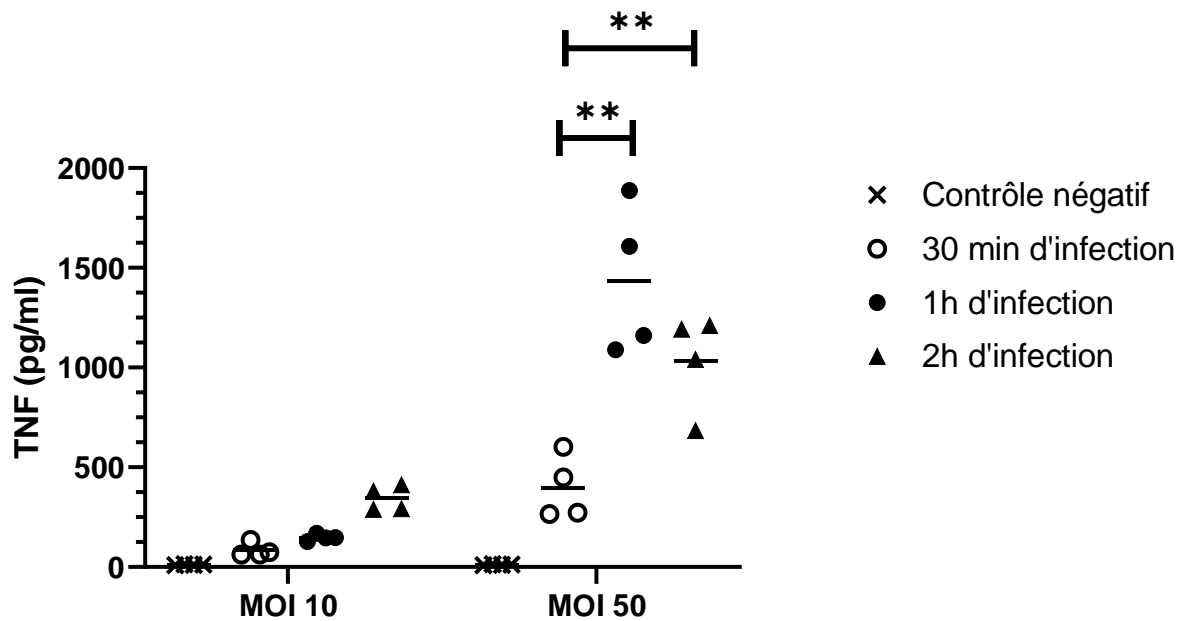


Figure 10. Impact du temps d'infection sur la production de TNF par les cellules MPI après contact avec la souche de *B. pertussis* B1917. Les cellules sont incubées avec B1917 à une MOI de 10 ou de 50 bactéries/cellule, pendant 30 minutes, 1h ou 2h. Le surnageant des cellules infectées est récupéré eaprès 24h et le TNF produit par les cellules est dosé par ELISA. Les résultats sont exprimés en pg/ml moyen de TNF. Le contrôle négatif correspond à des cellules non infectées. Test statistique utilisé : Kruskal-Wallis. ** correspond à une p-value < 0,01.

À une MOI de 10, nous détectons une augmentation de la concentration en TNF dans le surnageant après infection avec *B. pertussis*. Cette augmentation semble être fonction du temps de contact avec la bactérie, avec une sécrétion plus importante après 2h de contact.

Le niveau de production de TNF est encore plus grand à une MOI de 50, avec une augmentation significative dès 1h de contact, comparativement aux résultats obtenus lors d'une incubation de 30 min. Cette différence n'est pas retrouvée entre 1h et 2h de contact ce qui laisse penser que la production de TNF a alors atteint un plateau.

La production de TNF semble donc être dépendante de la MOI et du temps de contact bactéries-cellules. La prochaine étape de ce travail a été de déterminer si la quantité de bactéries internalisées était l'élément clé modulateur de la réponse TNF.

Nous avons dans un premier temps comparé le taux d'internalisation de B1917 ainsi que sa cinétique de survie intracellulaire après 30 minutes et 1h de contact avec les cellules MPI (Tableau 2, Figure 11).

CFU/million de cellules		
(moyenne +/- déviation standard)		
Temps après infection	30 minutes d'infection	1h d'infection
0h	$8,1 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6 \pm 4,7 \times 10^5$

Tableau 2. Internalisation de *B. pertussis* B1917 par les MPI. Après 30 minutes ou 1h d'incubation avec B1917, les MPI sont lavées avec un mélange PBS/antibiotique et PBS avant lyse avec de la Saponine 0,1%. Le lysat cellulaire est alors étalé sur boîtes Bordet-Gengou, afin de déterminer les Unités Formant Colonies 5 jours après. Les résultats sont exprimés en CFU/million de cellules.

Nous observons dans nos conditions que la quantité de bactéries internalisées est dépendante du temps de contact avec les MPI (Tableau 2, figure 11A). Néanmoins l'internalisation significativement plus élevée après 1h de contact ne semble pas affecter la cinétique de survie intracellulaire de B1917 puisque nous ne détectons pas de différence significative au niveau des pourcentages de bactéries intracellulaires 2h, 4h et 24h post infection. Dans les deux conditions une clairance bactérienne quasi-totale est observée 24h après infection (Figure 11B).

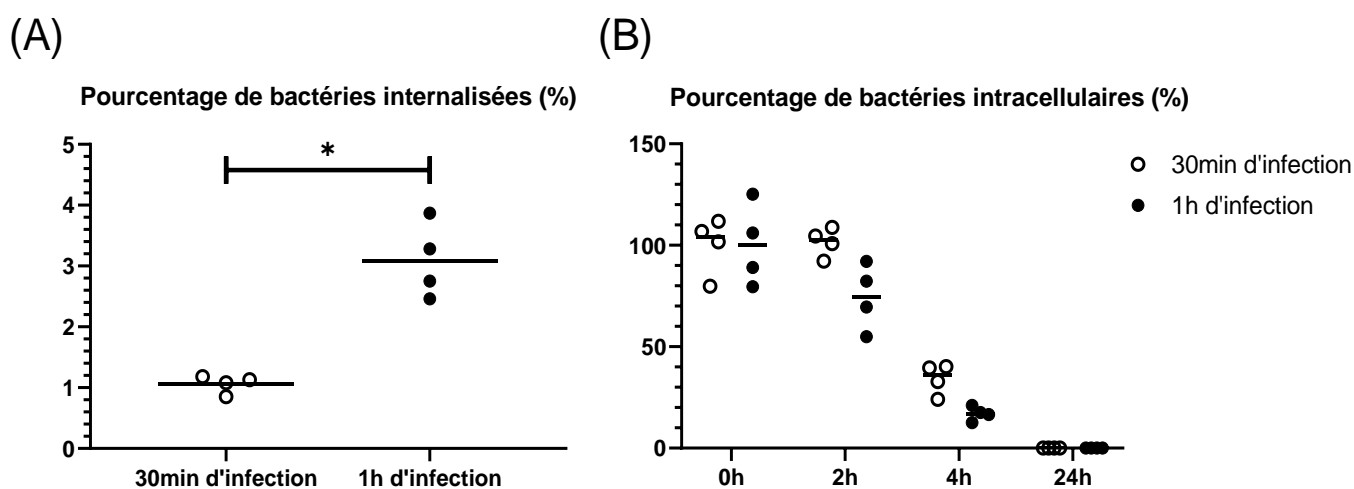


Figure 11. Survie intracellulaire de *B. pertussis* dans les MPI. Après 30 minutes ou 1h d'incubation avec B1917, les cellules sont lavées puis incubées avec un antibiotique pour éliminer les bactéries extracellulaires. Après un lavage en PBS, les cellules sont lysées et le lysat est étalé sur boîte Bordet-Gengou. Le pourcentage d'internalisation (A) est alors calculé en rapportant les UFC retrouvées à la fin de l'infection (T0) par rapport à l'inoculum initialement administré. Test statistique utilisé : Mann-Whitney. La cinétique de survie intracellulaire de B1917 (B) est quant à elle calculé en rapportant la quantité de bactéries retrouvée à l'instant T à la quantité de bactéries moyennes retrouvées à T0. Les résultats sont ensuite exprimés en pourcentage (%) de bactéries intracellulaires restantes. Test statistique utilisé : Two-Way ANOVA. * correspond à une p-value < 0,05.

Afin de déterminer l'influence de l'internalisation des bactéries sur la réponse TNF, les MPI ont été incubés avec un agent inhibiteur de la phagocytose, la Cytochalasine D, puis infectés avec B1917 (1h de contact). Comme précédemment la production de TNF a été quantifiée 24h après infection, par ELISA (Figure 12).

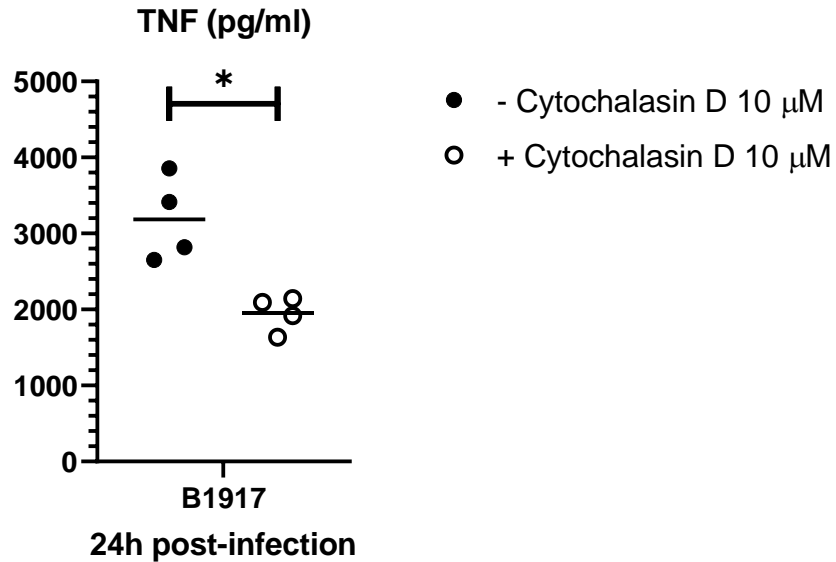


Figure 12. Production de TNF par les MPI après traitement avec la Cytochalasine D et infection par *B. pertussis*. Après une incubation de 30 minutes avec 10μM de cytochalasine D, les cellules sont incubées avec B1917 à une MOI de 50 bactéries/cellule pendant 1h. Le surnageant des cellules infectées est récupéré après 24h et le TNF produit par les cellules est dosé par ELISA. Les résultats sont exprimés en pg/ml moyen de TNF. Test statistique utilisé : Mann-Whitney. * correspond à une p-value < 0,05.

Nous observons une réduction significative de la production de TNF par les MPIs traités avec la cytochalasine D puis infectés (Figure 12). Cet effet n'est pas associée à une mortalité cellulaire (Figure 13).

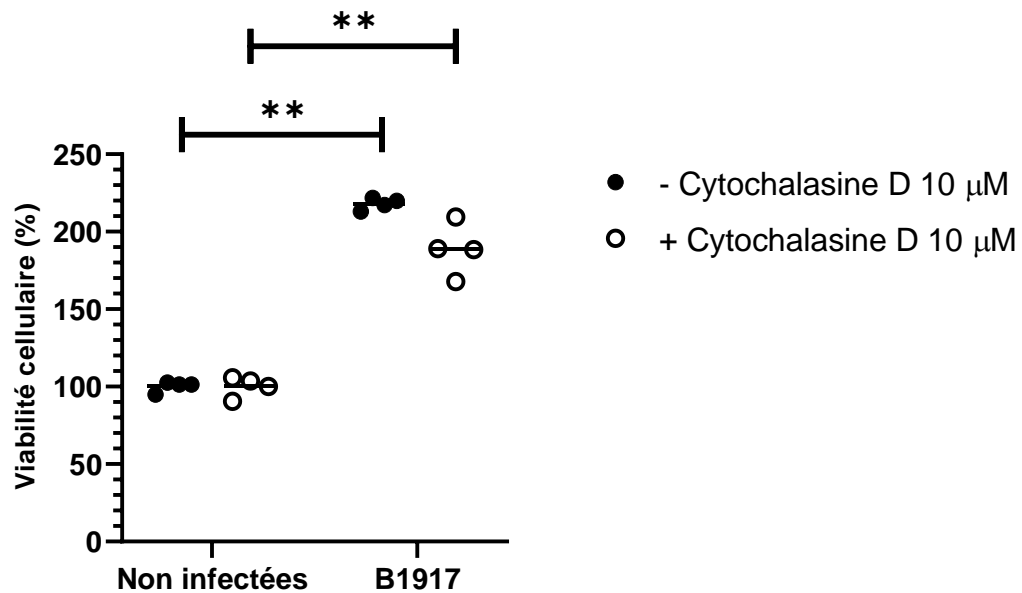


Figure 13. Viabilité des cellules MPIs après inhibition de la phagocytose de *B. pertussis*. Après une incubation de 30 minutes avec 10µM de cytochalasine D, les cellules sont mises en contact avec B1917 à une MOI de 50 bactéries/cellule pendant 1h. 24h après l'infection, l'analyse de la viabilité est effectuée avec un test MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à la valeur mesurée pour les cellules contrôles. Test statistique utilisé : Two-way ANOVA. ** correspond à une p-value < 0,01.

Ces résultats montrent que la réponse cytokinique induite par l'infection à *B. pertussis* est dépendante, au moins en partie, de la quantité de bactéries internalisées.

B.2 Conclusion et perspectives du modèle MPI :

Comparativement aux THP-1, nous avons observé une sécrétion de TNF plus importante par les MPIs en réponse à l'infection par *B. pertussis*. A l'instar des THP-1, cette sécrétion de TNF est dépendante de la MOI et plus précisément de la quantité de bactéries internalisées par la cellule. En effet, celle-ci s'en retrouve réduite lorsque la phagocytose de *B. pertussis* est inhibée.

Par rapport aux THP-1, l'une des forces du modèle MPI est qu'il s'agit de cellules non modifiées qui subissent peu de dérivations (Fejer et al, 2013). De plus, ces cellules ne nécessitent pas d'étape de différenciation, ce qui permet de développer des protocoles plus simples et d'avoir des réponses plus reproductibles.

Ces données laissent penser que les MPIs peuvent constituer un modèle intéressant pour l'étude de l'interaction *B. pertussis* avec les macrophages alvéolaires.

Néanmoins, la validation de ce modèle doit être effectuée en comparant les informations obtenues avec des données issues de macrophages alvéolaires primaires.

B.3 Infection de macrophages alvéolaires primaires murins avec *B. pertussis* :

Afin de confirmer la pertinence des données précédentes, nous avons isolé des macrophages alvéolaires primaires (AMs) issus de lavages broncho-alvéolaires de souris (BALs). En effet, près de 95% des cellules issues des BALs sont des macrophages alvéolaires SiglecF+ et CD11c+ (Busch et al, 2019). Ce processus nécessite de réaliser près de 10 lavages broncho-alvéolaires de souris qui doivent être ensuite purifiés par des centrifugations successives et une incubation avec un tampon d'érythrolyse. *In fine*, il est possible de récupérer jusqu'à 5×10^5 AMs/souris, ce qui représente de faibles quantités de cellules par rapport à ce que l'on peut obtenir avec des cultures cellulaires (entre 10 et 15 millions de cellules/flasque de cellules MPIs).

Ces AMs primaires sont infectés par la souche B1917 et comme précédemment la réponse TNF est quantifiée 24h post infection.

Les résultats obtenus sont exprimés en pg/ml de TNF/million de cellules et comparés aux valeurs observées dans les modèles THP-1 et MPI (Tableau 3).

	pg/ml moyen de TNF/million de cellules
Type cellulaire	moyenne +/- deviation standard
THP-1	176,81 +/- 74,82
MPI	7166,86 +/- 267,34
AMs murins	4296,03 +/- 1662,82

Tableau 3. Comparaison du niveau de production de TNF moyen par million de cellules pour chaque type cellulaire après infection avec *B. pertussis*. Après un contact de 1h avec la souche B1917 à une de MOI 50 bactéries/cellule, deux lavages et une incubation d'une heure en antibiotique sont effectués. 24h après infection, le surnageant des cellules est récupéré et le TNF est dosé par ELISA. Les résultats sont exprimés en pg/ml moyen de TNF par million de cellules.

Ces données montrent que suite à une infection par *B. pertussis* les AMs primaires produisent une quantité significative de TNF 24h post infection. Ce taux de TNF est comparable à celui observé avec les MPI, les valeurs obtenues avec les THP-1 étant en revanche 20 fois plus faibles.

Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que les cellules MPI ont une origine murine (Fejer et al, 2013), contrairement aux cellules THP-1 qui correspondent à des macrophages humains (Forrester et al, 2018). Ces éléments, associés au profil transcriptomique des MPI plus proche de celui des AM que les THP-1, viennent confirmer l'intérêt du modèle MPI pour l'étude des interactions de *Bordetella pertussis* avec les macrophages alvéolaires.

V) Discussion

Depuis plus de 60 ans, les questions relatives à l'expérimentation animale ont été le sujet de nombreuses discussions et débats qui ont tout naturellement découlés sur le développement d'une législation afin de protéger les animaux. Dans le cadre des activités de recherche, celle-ci se base notamment sur la règle des 3R qui incite le chercheur à développer et utiliser des alternatives au modèle animal, à réduire la quantité d'animaux utilisés et à raffiner la méthodologie expérimentale appliquée. De nombreux efforts ont été réalisés en ce sens avec différentes approches telles que la culture de cellules primaires ou l'utilisation de lignées cellulaires mais également le développement de modèles plus complexes comme les organoïdes, les organ-on-chip et même des modèles *in silico*. Malgré cela, la quantité d'animaux utilisée à des fins de recherche reste encore très importante, avec plus de 100 millions de rongeurs dénombrés aux Etats-Unis (Carbone et al, 2021) pour la période 2017-2018, et plus de 20 millions d'animaux en Chine en 2015 (Taylor et Alvarez, 2020).

En Europe, la Commission Européenne a estimé avec le système ALURES (« **Animal Uses Reporting – EU System** ») qu'il y avait plus de 10 millions d'animaux utilisés à des fins scientifiques en 2018, dont la moitié (52,11%) constituée de souris. Près de 46% de ces animaux sont destinés à la recherche fondamentale, 27% à la recherche translationnelle et appliquée et 22% à des études réglementaires et des activités de production (plaquettes, sérum, anticorps monoclonaux...). En 2019, la France représentait à elle seule 1/5 des animaux utilisés à des fins scientifiques en Europe, soit plus de 1,8 millions d'animaux d'après les statistiques rapportées par le MESRI. Bien qu'un cadre législatif strict ait été mis en place afin de Remplacer, Réduire et Raffiner l'utilisation du modèle animal et bien que les chercheurs travaillent activement à cela, il n'y a finalement pas eu pour le moment de diminution drastique du nombre d'animaux puisque les chiffres de 2019 indiquent seulement une diminution de 2,8% comparativement à 2016.

Ceci peut s'expliquer par le fait que les chercheurs sont soumis à des contraintes liées à leurs thématiques propres. Ainsi, la physiopathologie de certaines maladies, ou la pharmacocinétique de certains médicaments tels que les anticorps monoclonaux sont encore mal comprises et nécessitent l'utilisation du modèle animal. Par ailleurs, des obligations réglementaires s'opposent à la volonté introduite avec les 3Rs de diminuer le recours aux animaux et conduisent à des décisions perçues comme paradoxales

par le corps des chercheurs. Ainsi de nombreuses études réglementaires comme celles à établir pour l'Agence Européenne du Médicament ne peuvent être réalisées uniquement à l'aide d'approches *in vitro* ou *in silico*, bien que ces dernières apportent de premiers éléments de réponse. C'est par exemple le cas des études de toxicologie aiguë ou chronique des médicaments en développement pour lesquelles le recours au modèle animal est nécessaire pour que les résultats soient validés.

Malgré tout, la volonté d'abandonner le recours au modèle animal est de plus en plus forte. Très récemment en Septembre 2021, le Parlement Européen a adopté une nouvelle résolution visant à accélérer l'innovation pour s'affranchir de l'utilisation d'animaux dans la recherche et l'enseignement. Celle-ci a résonné comme un coup de tonnerre dans le milieu de la recherche et inquiète plusieurs organisations telles que l'Association pour la Recherche Animale Européenne (EARA) ou encore la Ligue Européenne des Universités de Recherche (LERU).

Le développement d'alternatives à la fois peu coûteuses, reproductibles et pertinentes permettant de remplacer les modèles animaux est donc plus que jamais une priorité. A ce titre, j'ai été amené à utiliser un nouveau modèle cellulaire, le modèle MPI, dans le cadre de l'étude des interactions de *Bordetella pertussis* avec les macrophages alvéolaires.

Bien qu'il existe de nombreux modèles de macrophages dans la littérature, la majorité d'entre eux sont des lignées cellulaires soumises à des dérives potentielles et qui d'un point de vue phénotypique sont plus proches des macrophages dérivés de monocytes que des macrophages alvéolaires (Forrester et al, 2018). En utilisant le modèle THP-1 j'ai pu montrer que ces cellules sont capables d'internaliser et d'éliminer rapidement *B. pertussis*. En réponse à l'infection, les THP-1 sécrètent différentes cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 β et l'IL-8. J'ai pu montrer que cette production est modulée par la quantité de bactéries infectantes. En revanche, aucune influence de la virulence de *B. pertussis* n'a été mise en évidence.

Ces derniers constituent une population résidente qui provient originellement du sac embryonnaire (Guilliams et al, 2013), contrairement aux macrophages dérivés de monocytes qui sont d'origine médullaire. Les macrophages alvéolaires se caractérisent par une demi-vie extrêmement longue et un faible taux de renouvellement *in vivo* (Guilliams et al, 2013). Leur survie dépend notamment d'un

facteur de croissance essentiel sécrété en faible quantité dans les tissus qui est le GM-CSF.

De façon intéressante, les cellules MPI correspondent à des cellules de foie embryonnaire fœtal. L'ajout de GM-CSF dans le milieu de culture est nécessaire à la prolifération de ces cellules qui présentent alors un phénotype très similaire à celui des macrophages alvéolaires. Lors d'une infection par *B. pertussis* j'ai pu montrer que la cinétique de survie intracellulaire de la bactérie est similaire dans les modèles THP-1 et MPI, une clairance quasi totale de la bactérie étant observée 24h après infection. Dans les deux cas, l'infection bactérienne stimule la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF, l'IL-1 β et l'IL-8. Cette production est modulée par la quantité de bactéries internalisées mais ne semble pas dépendre de la virulence de *B. pertussis*. La magnitude de la réponse TNF observée avec les MPI s'est avérée très similaire à celle obtenue avec des macrophages alvéolaires murins primaires. A contrario, l'infection de cellules THP-1 conduit à une sécrétion plus faible de TNF suite à l'infection. Les MPI constituent donc un bon modèle pour l'étude des interactions entre *B. pertussis* et les macrophages alvéolaires. L'utilisation de ces cellules permet de s'affranchir des problèmes de dérive que l'on retrouve avec les lignées cellulaires. De plus, contrairement aux THP1, les MPI ne nécessitent pas d'étape de différenciation ce qui conduit à une reproductibilité plus élevée des données.

Les différences observées entre THP-1 et MPI pourraient s'expliquer par la plus grande proximité phénotypique des cellules MPI avec les macrophages alvéolaires. L'origine humaine des THP-1 pourrait également en partie être responsable des différences observées. *B. pertussis* étant un pathogène strictement humain, on peut imaginer que la bactérie induise une réponse inflammatoire plus faible de la part des THP-1, ce qui favoriserait sa persistance. Ces données sont à mettre en parallèle avec celles obtenues par Lamberti et son équipe (Lamberti et al, 2010), qui suggèrent qu'une faible quantité de bactérie peut survivre et se répliquer au sein des THP-1.

Un des avantages du modèle MPI réside dans la quantité de cellules qui peut être obtenue en très peu de temps (\approx 10 à 15 millions de cellules par flasque) contrairement aux macrophages alvéolaires primaires dont l'extraction nécessite de réaliser des lavages broncho-alvéolaires sur des souris avec *in fine* un rendement très faible (entre 2×10^5 à 5×10^5 /souris). L'utilisation du modèle MPI s'avère relevante d'un point de vue scientifique mais présente également un véritable intérêt éthique puisqu'ainsi

l'usage des animaux au sein de cette étude peut être beaucoup plus limité avec pour unique objectif de confirmer les données *in vivo*. En conclusion, cette étude démontre l'intérêt du modèle MPI pour l'étude des interactions de *B. pertussis* avec macrophages alvéolaires. De façon plus large elle met en évidence l'intérêt des modèles cellulaires qui permettent de générer les premières données et représentent un véritable intérêt éthique et un enjeu dans le remplacement du modèle animal, à une période où les conditions de l'utilisation de ce dernier deviennent de plus en plus strictes.

VI) Annexes

Composition des milieux de culture utilisées :

Milieu Stainer-Scholte (SS) : C'est un milieu liquide contenant une fraction A et une fraction B ajoutée extemporanément Pour 1 litre de fraction A, on ajoute 10 ml de fraction B.

Fraction A : Pour 1 litre de fraction A	Fraction B : Pour 10 mL de fraction B
Na-L-Glutamate (Sigma Aldrich®) : 11.84g	L-cystéine (Merck®) : 40mg
L-Proline (Sigma Aldrich®) : 0.24g	FeSO ₄ 7H ₂ O (Merck®) : 10mg
NaCl (Euromedex®) : 2.5g	Niacine (Sigma Aldrich®) : 4mg
KH ₂ PO ₄ (Fluka®) : 0.5g	Acide ascorbique (Fluka®) : 400mg
KCl (Euromedex®) : 0.2g	Glutathion (Sigma Aldrich®) : 150mg
MgCl ₂ 6H ₂ O (VWR®) : 0.1g	
CaCl ₂ 2H ₂ O (Sigma Aldrich®) : 20 mg	
TRIS (Euromedex®) : 1.5g	
Casaminoacides (BD®) : 10g	
Cyclodextrine (Sigma Aldrich®): 1g	
H ₂ O MiliQ : Quantité Suffisante Pour (QSP) 1 litre	H ₂ O MiliQ : QSP 10 ml

VI) Références bibliographiques

1. Ahmad JN, Holubova J, Benada O, Kofronova O, Stehlik L, Vasakova M, et al. Bordetella adenylate cyclase toxin inhibits monocyte-to-macrophage transition and dedifferentiates human alveolar macrophages into monocyte-like cells. *MBio*. 2019;10(5):1–16.
2. Antoine R, Alonso S, Raze D, Coutte L, Lesjean S, Willery E, et al. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*. 2000;182(20):5902–5.
3. Bovard D, Iskandar A, Luettich K, Hoeng J, Peitsch MC. Organs-on-a-chip. *Toxicol Res Appl*. 2017;1:239784731772635.
4. Busch C, Favret J, Geirsdóttir L, Molawi K, Sieweke M. Isolation and Long-term Cultivation of Mouse Alveolar Macrophages. *Bio-Protocol*. 2019;9(14):1–13.
5. Carbone L. Estimating mouse and rat use in American laboratories by extrapolation from Animal Welfare Act-regulated species. *Sci Rep*. 2021;11(1):1–6.
6. Carbonetti NH, Artamonova G V., Van Rooijen N, Ayala VI. Pertussis toxin targets airway macrophages to promote *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract. *Infect Immun*. 2007;75(4):1713–20.
7. Daniels HL, Sabella C. *Bordetella pertussis* (Pertussis). *Pediatr Rev*. 2018;39(5):247–57.
8. Dranoff G, Crawford AD, Sadelain M, Ream B, Rashid A, Bronson RT, et al. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* (80-). 1994;264(5159):713–6.
9. Duque GA, Descoteaux A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5(OCT):1–12.
10. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci*. 2016;152:244–8.
11. Williams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med*. 2013;210(10):1977–92.
12. Iakobachvili N, Peters PJ. Humans in a dish: The potential of organoids in modeling immunity and infectious diseases. *Front Microbiol*. 2017;8(DEC):1–7.
13. Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020;21(10):571–84.
14. Lamberti YA, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Harvill ET, Rodriguez ME. Intracellular trafficking of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infect Immun*. 2010;78(3):907–13.
15. Low LA, Mummery C, Berridge BR, Austin CP, Tagle DA. Organs-on-chips: into the next decade. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(5):345–61.
16. Madden JC, Enoch SJ, Paini A, Cronin MTD. A Review of In Silico Tools as Alternatives to Animal Testing: Principles, Resources and Applications. *Altern Lab Anim*. 2020;48(4):146–72.
17. Melvin JA, Scheller E V., Miller JF, Cotter PA. *Bordetella pertussis* pathogenesis: Current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(4):274–88.
18. Mielcarek N, Debrie AS, Raze D, Bertout J, Rouanet C, Younes A Ben, et al. Live

- attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* 2006;2(7):0662–70.
19. Montaña F, Grinstein S, Levin R. Quantitative Phagocytosis Assays in Primary and Cultured Macrophages. *Neonatal Intensive Care Nurs.* 2018;1784:151–63.
 20. Mooi FR, Van Loo IHM, Van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, et al. Bordetella pertussis strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. Vol. 15, *Emerging Infectious Diseases*. 2009. p. 1206–13.
 21. Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, et al. Pathology and Pathogenesis of Fatal Bordetella pertussis Infection in Infants. *Clin Infect Dis.* 2008;47(3):328–38.
 22. Rivera-Millot A, Lesne E, Solans L, Coutte L, Bertrand-Michel J, Froguel P, et al. Characterization of a Bvg-regulated fatty acid methyl-transferase in Bordetella pertussis. Vol. 12, *PLoS ONE*. 2017.
 23. Taylor K, Alvarez LR. An Estimate of the Number of Animals Used for Scientific Purposes Worldwide in 2015. *Altern Lab Anim.* 2019;47(5–6):196–213.
 24. Tomlinson GS, Booth H, Petit SJ, Potton E, Towers GJ, Miller RF, et al. Adherent human alveolar macrophages exhibit a transient pro-inflammatory profile that confounds responses to innate immune stimulation. *PLoS One.* 2012;7(6).
 25. Vandebriel RJ, Hellwig SMM, Vermeulen JP, Hoekman JHG, Dormans JAMA, Roholl PJM, et al. Association of Bordetella pertussis with host immune cells in the mouse lung. *Microb Pathog.* 2003;35(1):19–29.
 26. Wang SW, Parhar K, Chiu KJ, Tran A, Gangoiti P, Kong J, et al. Pertussis toxin promotes macrophage survival through inhibition of acid sphingomyelinase and activation of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway. *Cell Signal.* 2007;19(8):1772–83.
 27. Forrester MA, Wassall HJ, Hall LS, Cao H, Wilson HM, Barker RN, et al. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol.* 2018;332(July):58–76.
 28. Yeung KHT, Duclos P, Nelson EAS, Hutubessy RCW. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(9):974–80.
 29. Bernard NJ, Finlay CM, Tannahill GM, Cassidy JP, O'Neill LA, Mills KHG. A critical role for the TLR signaling adapter Mal in alveolar macrophage-mediated protection against Bordetella pertussis. *Mucosal Immunol.* 2015;8(5):982–92.
 30. Fejer G, Wegner MD, Gyory I, Cohen I, Engelhard P, Voronov E, et al. Nontransformed, GM-CSF-dependent macrophage lines are a unique model to study tissue macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(24):E2191–8.
 31. Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K, Wright SD. Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: Macrophage CR3 (α M β 2, CD11b CD18) binds filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. *Cell.* 1990;61(7):1375–82.

FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Année Universitaire 2021/2022

Nom : KHITER

Prénom : Fethi

Titre de la thèse : Intérêt éthique et scientifique des modèles cellulaires dans l'étude de la relation hôte-pathogène : exemple de l'infection à *Bordetella pertussis*, agent de la coqueluche

Mots-clés : éthique en recherche ; modèles cellulaires ; relation hôte-pathogène ; *Bordetella pertussis*

Résumé :

Lors de mon cursus au sein de la faculté de pharmacie, l'une des valeurs majeures qui m'a été transmise par le corps des chercheurs et enseignants-chercheurs est que la Science actuelle a une connexion profonde avec la Société et ses enjeux, et notamment le combat contre les maladies humaines. Dans cet objectif, la modélisation de réponses biologiques les caractérisant sont nécessaires à l'approfondissement des connaissances et au développement d'outils préventifs, diagnostiques et thérapeutiques. L'objectif de cette thèse de pharmacie est de comparer plusieurs modèles de macrophages pour l'étude des interactions avec *B. pertussis* et d'évaluer l'intérêt à la fois scientifique et éthique de ces modèles cellulaires, afin de mettre en avant les avantages et les inconvénients qu'ils peuvent avoir et montrer que la réponse à une question scientifique nécessite de l'approcher sous différents angles et modèles.

Membres du jury :

Président :

CARNOY Christophe, PU Université de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

Directeur de thèse :

MIELCAREK Nathalie, DR2 INSERM, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

Assesseurs :

ROUANET-VIDAL Carine, CR Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

WOLOWCZUK Isabelle, DR2 CNRS, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

BLONDIAUX Nicolas, MCU-PH Université de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille

Membre(s) extérieur(s) :

BROCHOT Etienne, MCU-PH Université de Picardie Jules Vernes