



HAL
open science

Tropisme cellulaire initial du SARS-CoV-2 dans le poumon humain : du poumon entier aux sous-populations de macrophages

Carla Gouin

► **To cite this version:**

Carla Gouin. Tropisme cellulaire initial du SARS-CoV-2 dans le poumon humain : du poumon entier aux sous-populations de macrophages. Immunité innée. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL147 . tel-04452724

HAL Id: tel-04452724

<https://theses.hal.science/tel-04452724>

Submitted on 12 Feb 2024

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

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

Tropisme cellulaire initial du SARS-CoV-2 dans le poumon humain : du poumon entier aux sous-populations de macrophages

Initial cellular tropism of SARS-CoV-2 in the human lung: from whole lung to macrophage subpopulations

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Science de la vie et de la santé
Graduate School : Sciences de la vie et santé. Référent : Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines

Thèse préparée dans l'unité de recherche VIM (Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE)
sous la direction d'Isabelle SCHWARTZ-CORNIL, Directrice de recherche de classe
exceptionnelle.

Thèse soutenue à Jouy-en-Josas, le 20 décembre 2023, par

Carla GOUIN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Philippe DEVILLIER PU-PH, UVSQ-Hôpital Foch	Président du Jury
Pascal BARBRY Directeur de recherche, CNRS-IPMC	Rapporteur & Examineur
Sophie LE PODER Professeure, DVM-PhD, EnvA-ANSES-INRAE	Rapporteur & Examinatrice
Nicolas BERTHO Chargé de recherche, INRAE-Oniris	Examineur

Titre : Tropisme cellulaire initial du SARS-CoV-2 dans le poumon humain : du poumon entier aux sous-populations de macrophages

Mots clés : SARS-CoV-2, poumon, macrophage, monocyte, PPEV, scRNAseq

Résumé : Les mécanismes pathogéniques impliqués dans les phases initiales de l'infection par le SARS-CoV-2 restent mal compris au niveau pulmonaire, en dépit d'une abondante activité de recherche depuis l'émergence de la pandémie COVID-19. Des travaux conduits sur des modèles de culture de cellules humaines isolées, d'explants, d'organoïdes ou de lung-on-a-chip ont donné des résultats discordants quant aux cibles initiales pulmonaires principales du virus et à la réponse innée induite.

Dans ce travail de thèse, j'ai évalué un modèle original d'étude des premières étapes de l'infection virale qui consiste à infecter un poumon humain entier maintenu vivant *ex vivo* selon une technique utilisée couramment en transplantation pulmonaire, permettant ainsi d'étudier l'infection dans des conditions respectant les interactions spatiales. Cette technique (perfusion pulmonaire *ex vivo*, PPEV) consiste à ventiler et perfuser des poumons pendant quelques heures et conduit à évaluer et réhabiliter des poumons dits marginaux. Par la technique de RNA-seq sur cellule unique, nous avons découvert que le poumon entier maintenu sous PPEV sans virus présente un programme d'activation génique particulier que nous avons exploré dans un premier volet de la thèse. Ainsi nous avons mis en évidence, que la PPEV en elle-même induit une réponse inflammatoire qui varie en fonction du temps et des types cellulaires. Cette réponse s'accompagne d'une signature génique indiquant une réduction de la signalisation du cytosquelette dans les cellules épithéliales alvéolaires de type 2 et les cellules endothéliales, ainsi qu'une réduction de la migration et de l'activation des lymphocytes et cellules dendritiques. Ce travail révèle pour la première fois la réponse biologique à la PPEV en fonction des types cellulaires, potentiellement associée à des effets sur les suites cliniques. Dans un second temps, nous avons infecté sous PPEV des poumons avec différents isolats viraux et réalisé des analyses de RNA-seq sur cellule unique qui ont révélé que les macrophages

alvéolaires (AMs) et ceux dérivés des monocytes (MoMacs) sont les cibles principales du virus. Par contre, les cellules épithéliales et les sous-populations de monocytes pulmonaires ne sont pas significativement associées au virus. Nous avons étudié la réponse de différents types de monocytes/macrophages *in vitro* après dissociation de tissus pulmonaire humain, tri en cytométrie puis culture avec le virus. Nous avons révélé des réponses spécifiques inflammatoires en fonction des populations cellulaires, des souches virales et des doses, les cellules MoMacs étant les plus inflammatoires en réponse au virus. Ces résultats originaux mettent en évidence le rôle des macrophages à l'étape initiale de l'infection et suggèrent que leur réponse pourrait conditionner l'apparition des lésions ultérieures associées à la gravité en fonction de la composition initiale alvéolaire en sous populations de monocytes/macrophages, de la souche virale et de la dose.

Dans un projet parallèle, j'ai étudié une méthode visant à réduire cette inflammation, sur poumon de porc, en procédant à une dialyse du perfusé pour éliminer les déchets métaboliques accumulés. Nous avons montré que la dialyse ne réduit pas l'inflammation, mais l'augmente plutôt, après 6 ou 12 heures.

Au total, ce projet de thèse a montré les atouts et les limites d'un modèle d'infection virale de poumon entier maintenu *ex vivo*. Il a mis en lumière l'implication des sous-populations de monocytes/macrophages dans les premières étapes de l'infection par le SARS-CoV-2. Il a également conduit à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la technique de maintien *ex vivo* du poumon, ce qui sera utile pour améliorer la conduite de la transplantation.

Title : Initial cellular tropism of SARS-CoV-2 in the human lung: from whole lung to macrophage subpopulations

Keywords : SARS-CoV-2, lung, alveolar macrophages, monocyte derived macrophages, EVLP, scRNAseq

Abstract : The pathogenic mechanisms of the initial phase of the SARS-CoV-2 infection remain poorly understood at the pulmonary level, despite strong research efforts since the emergence of the COVID-19 pandemics. Studies conducted with various models, including isolated human cell cultures, explants, organoids or lung-on-a-chip systems have generated conflicting results concerning the primary pulmonary targets of the virus and the induced innate immune responses.

In my thesis, I evaluated an original model for studying the early stages of viral infection. This model involves the infection of a whole lung that is maintained *ex vivo* with a technique used in lung transplantation, allowing the study of infection under conditions that preserve spatial interactions. This technique (ex-vivo lung perfusion, EVLP) involves ventilating and perfusing lungs for several hours and has the potential to evaluate and rehabilitate marginal lungs. We conducted single-cell RNA-seq analyses and we discovered that the whole lung maintained under EVLP without the virus displayed a specific gene activation program, which we analyzed in the first part of my thesis. We found that EVLP in itself induced an inflammatory response that varied over time and across cell types. This response was accompanied by gene signatures indicating reduced signaling of cytoskeleton in alveolar type 2 epithelial cells and endothelial cells, as well as reduced cell migration and activation of lymphocytes and dendritic cells. This work reveals, for the first time, the biological responses to EVLP based on cell types that may be related to the clinical outcomes. In the second part of my thesis, we infected lungs under EVLP with different viral isolates and conducted single-cell RNA-seq analyses. These analyses revealed that alveolar macrophages (AMs) and monocyte-derived macrophages (MoMacs) are the primary targets of the virus. Epithelial cells and pulmonary monocyte subpopulations were not significantly associated with the virus. We studied the response of the monocyte/macrophage populations *in vitro* after dissociation of human lung tissue, flow cytometry sorting and culture with the virus. We observed specific inflammatory responses

depending on cell subsets, viral strain and doses, with MoMacs being the most inflammatory. Our original work reveals the role of monocyte/macrophage subsets in the initial phases of the SARS-CoV-2 infection and suggests that the initial response of alveolar monocyte/macrophages will drive the subsequent development of lung injuries, depending on the composition in AMs and MoMacs, the viral strain and doses.

In a parallel project, we investigated the effects of a method aimed at reducing the inflammation during EVLP, on porcine lung, by performing a dialysis of the perfusate to remove accumulated metabolic wastes. However, our findings showed that dialysis did not reduce inflammation; rather, it increased inflammation after 6 or 12 hours.

Overall, this thesis project has demonstrated the strengths and limitations of a whole lung viral infection model maintained *ex-vivo*. It has highlighted the involvement of monocyte/macrophage subpopulations in the initial step of SARS-CoV-2 infection and has also contributed to a better understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in the *ex vivo* lung maintenance technique, which will be useful for improving lung transplantation procedures.

REMERCIEMENTS

On pourrait penser que les remerciements sont la partie la plus facile à écrire d'une thèse. Cependant, à mes yeux, cela est la tâche la plus compliquée, je vais faire de mon mieux pour être à la hauteur et n'oublier personne.

Dans un premier temps, je voudrais remercier Pascal Barbry ainsi que Sophie Le Poder qui ont accepté de relire cette thèse et de me donner un avis critique sur mon manuscrit malgré leurs emplois du temps chargés. Je remercie également Philippe Devillier et Nicolas Bertho d'avoir accepté de prendre sur leur temps pour faire partie de mon jury.

Mes remerciements vont ensuite à ma directrice de thèse, Isabelle Schwartz. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet si passionnant. Merci d'avoir toujours été disponible pour moi au cours de ces presque 4 années, de m'avoir permis de prendre confiance en moi ainsi qu'en autonomie. Merci pour ta patience, surtout lors de l'écriture de ce manuscrit, toutes nos discussions enrichissantes et tous tes conseils si précieux. Je pars de cette équipe avec tout le bagage nécessaire pour m'intégrer au mieux dans le monde de la recherche. Merci pour tout.

Céline, je n'ai pas les mots, tu as été d'un soutien qui a dépassé le cadre professionnel. Merci de m'avoir formée à tant de techniques, d'avoir tenu bon malgré mon caractère pas toujours simple. On ne parlera pas de nos trajets, parfois chaotiques, pour aller à Foch, ni de nos discussions parfois tout aussi chaotiques. Merci. Maintenant il faut qu'on s'organise cette sortie pour aller voir un match du PSG depuis le temps qu'on en parle!

Florentina, merci pour ta bonne humeur quotidienne et ton enthousiasme. Merci pour tous ces cierges brûlés en amont de chaque expérience importante. Il faudrait qu'on fasse une étude pour voir le lien entre les cierges et la réussite de nos expériences car je suis persuadée qu'il y a une corrélation.

Merci au reste de mon équipe : Delphyne, mon acolyte de l'aventure ICARE, sans toi cette aventure n'aurait pas été la même. Merci d'avoir retrouvé mes chaussures (cachées par un certain collègue) lors de notre première expérience ICARE en duo. Bravo pour toutes ces réussites cette dernière année, je suis heureuse d'avoir pu assister à ton HDR après en avoir tant entendu parler.

Sabine, merci pour toutes ces discussions plus qu'enrichissantes, plus d'une fois tu m'as permis d'aborder le sujet avec une autre vision.

Cécile et Caroline, merci pour toutes nos discussions professionnelles ou non permettant de pouvoir se changer les idées.

Comment ne pas remercier le bureau 736 et ses nombreux occupants, actuels ou passés :

Claire, merci pour ton soutien depuis le début de ma thèse. Merci d'avoir toujours été là pour m'écouter me plaindre quand rien ne marchait et m'écouter tout court quand j'avais besoin de parler. Merci pour tous ces moments au labo, nos pauses café en refaisant le monde mais aussi en dehors du labo. Les souvenirs d'un week-end en combinaison orange avec peu d'heure de sommeil et nombreuses péripéties resteront gravés dans ma mémoire ! Courage pour cette dernière année, je sais que tu vas t'en sortir haut la main.

Jérôme, aka Jeje, je pense que tu sais à quel point je te remercie pour beaucoup de choses. Soutien indéfectible depuis le début de ma thèse et jusqu'à la fin. Merci de m'avoir appris quelques notions chirurgicales pendant nos matinées au bloc, nos discussions, nos apéros, nos fou-rires.

Maxime, comme Jérôme, tu sais à quel point je te remercie. Si j'arrive à la fin de cette thèse, c'est en partie grâce à toi. Merci de m'avoir écoutée et remontée le moral les jours où ça n'allait pas, merci de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi, merci d'avoir toujours pris le temps d'être là.

Antoine, je ne sais pas si vraiment je dois te remercier finalement. Tu m'as fait plonger dans mon cauchemar : R. Mais finalement, tu m'as aidée à comprendre et apprécier ce logiciel, alors merci, je ne pensais pas que c'était possible. Merci pour ces matinées café à parler de théories diverses et variées, merci pour le protocole café, ce fut une étude intense qui porte ses fruits encore aujourd'hui, merci pour la déco du bureau et merci pour toutes les viennoiseries apportées le matin !

Vincent, le petit jeune du bureau. Tu es arrivé en territoire conquis par V2i et tu t'es intégré comme si tu avais fait partie du bureau depuis toujours. Merci pour toutes nos discussions, d'avoir toujours été une oreille attentive et de m'avoir donné de bons conseils (que je n'ai pas forcément écoutés...). Et je dois l'avouer je suis contente que tu ne sois pas parti en cette fin d'année.

Quentin, merci d'avoir été si gentil lors de mon arrivée dans l'équipe. C'était un plaisir de venir travailler à Foch avec toi et de retrouver ta bonne humeur sans faille malgré un cytomètre trieur parfois capricieux qui nous rendait chèvres.

Il faut également que je remercie les thésardes de l'aile Ouest : Soraya, Elise et Célia. Je pense que vous savez déjà tout, vous aussi. Merci de m'avoir permis de me changer les idées lorsque ça n'allait pas. La dernière année de thèse est compliquée et pourtant,

avec vous, cela m'a permis de la vivre plus « facilement ». Merci pour tous ces souvenirs, le week-end à Strasboubou et les pauses café au soleil !

Merci à Bruno de m'avoir appris tant de chose, que ce soit sur la virologie ou du travail en laboratoire confiné. Ce laboratoire qui peut faire peur d'extérieur mais dans lequel j'ai passé tant de bons moments. Merci pour ta bonne humeur constante, ta disponibilité au quotidien et nos nombreuses discussions. Grâce à toi, j'ai également appris que regarder un reportage sur les trous noirs à 3h du matin n'est pas forcément une bonne idée quand il faut tenir éveillé toute la nuit. Merci pour tout !

Merci à Luc pour ta patience extraordinaire face à moi qui ne comprenais pas grand-chose aux analyses bio-informatiques. Et je m'excuse par avance de ne pas avoir bien prononcé "Wuhan" tout au long de ma présentation, j'espère que tu ne m'en tiendras pas rigueur.

Merci à Marc et Thien pour votre bienveillance et votre disponibilité. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer ce qu'est le scRNAseq au cours de nos réunions, me permettant de mieux comprendre cette technique au fur et à mesure de ma thèse.

Merci à toi Claudia, c'était un réel plaisir de venir travailler avec toi !

Merci à Edouard, Matthieu et Julien pour votre gentillesse incroyable tout au long de cette aventure. Travailler à vos côtés a été extrêmement enrichissant et je repars avec des étoiles pleins les yeux d'avoir pu découvrir ce côté médical que j'affectionne tant.

Merci à l'ensemble des personnes de la VIM pour votre accueil, vos sourires et nos discussions lors de ces presque 4 années passées avec vous.

Merci à tous mes amis, Yvanna, Léontine, Typhaine, Clara, Romain, Aurélien, Hildegarde, Lisa, Sarah. Vous avez été d'un soutien indéfectible, me permettant de me changer les idées lorsqu'il le fallait et de me booster lorsque le moral n'était plus là. Je sais que parfois j'ai été plus que distante de par mon travail, mais sachez que vous m'avez permis de tenir plus d'une fois dans cette aventure si prenante alors merci.

À mes parents, après toutes ces années à me demander : Est-ce que ça avance... Et bien c'est bon, j'ai enfin terminé ma thèse ! Merci de m'avoir soutenue, encouragée et d'avoir cru en moi pendant ces longues années d'études, pour vos encouragements et pour tout votre amour. À mon grand frère Alexandre et à Margaux, merci d'être ce que vous êtes, d'avoir été d'un soutien sans faille ! Si j'arrive au bout de cette formation et que j'obtiens le titre de Docteur, c'est en partie grâce à vous.

Merci à toute ma famille, qui a su me supporter pendant ces longues années. Merci pour le soutien sans faille qui m'a permis de tenir tout au long de cette aventure doctorale. Maintenant je vais arrêter de vous embêter avec le SARS-CoV-2 !

Abréviations :

J'ai utilisé, à part quelques exceptions, l'abréviations anglaise et j'ai fourni la traduction française correspondante. Dans certains cas, la traduction anglaise est donnée entre guillemets.

ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ALI : Interface air-liquide

AM : Macrophage alvéolaire

APC : Cellule présentatrice d'antigène

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BAL : Lavage broncho-alvéolaire

BPCO : Bronchopneumonie chronique obstructive

cDC2 : Cellule dendritique conventionnelle de type 2

cMo : Monocyte classique

CXCL : Ligand de chimiokine

DAMPs : Motif moléculaire associé aux dégats

DC : Cellule dendritique

DEG : Expression différentielle des gènes

DP : Dialyse pédiatrique

DPG : Dysfonction primaire du greffon

E : Enveloppe

ER : Réticulum endoplasmique

FcR : Récepteur de la fraction constante des immunoglobulines

GS : Gold standard

GSEA : Gene set enrichment analysis

HCMV : Cytomégalovirus humain

HIV : Virus de l'immunodéficience humaine

IFN : Interféron

IFNAR : Récepteur d'interféron alpha/beta

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IM : Macrophage interstitiel
iMo : Monocyte intermédiaire
IPA : Ingenuity pathway analysis
IRF : Facteur de régulation des interférons
ISG : Gène stimulé par l'interféron
LA : Oreillette gauche
LDH : Lactate déshydrogénase
LT : Lymphocyte T
M : Membrane
MAVS : Protéine de signalisation antivirale mitochondriale
MDSC : Cellule suppressive d'origine myéloïde
MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité
Mo : Monocyte
MOI : Multiplicité d'infection
MoMac : Macrophage dérivé des monocytes
MP : Macrophage
MSC : Cellule souche mésenchymateuse
N : Nucléocapside
ncMo : Monocyte non-classique
NET : Pièges extracellulaire de neutrophiles
NK : Lymphocyte « Natural killer »
NLR : Récepteur de type NOD
Np : Neutrophile
Nsp : Protéine non structurale
OCS : « Organ Care System »
ORF : Cadre de lecture
PA : Artère pulmonaire
PAMP : Motif moléculaire associé aux pathogènes
PCLS : Section fine de tissu pulmonaire
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde
PFU : Plage de lyse
PPEV : Perfusion Pulmonaire *ex vivo*
PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

RBD : Domaine de liaison au récepteur

RLR : Récepteur de type RIG-I

R0 : Reproduction initiale

S : Spicule

scRNA-seq : RNA-seq sur cellule unique

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

TLR : Récepteur Toll like

TMPRSS2 : Protéase transmembranaire à sérine 2

TNF : Facteur de nécrose tumorale

WL : Wuhan-like

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
1 INTRODUCTION	2
1.1 LE SARS-CoV-2	2
1.2 LES VARIANTS.....	4
1.3 LES RECEPTEURS PRESENTS CHEZ L'HOMME.....	5
1.3.1 <i>Le récepteur canonique – ACE2</i>	6
1.3.2 <i>Les récepteurs alternatifs</i>	7
1.4 LA MALADIE INDUITE CHEZ L'HOMME	11
1.5 LA PHYSIOPATHOLOGIE CELLULAIRE.....	13
1.5.1 <i>Le rôle des interférons de type I et III dans l'immunopathologie</i>	13
1.5.2 <i>Le syndrome inflammatoire associé à l'infection par le SARS-Cov-2 et les types cellulaires impliqués</i>	14
1.5.2.1 Les molécules de l'inflammation	14
1.5.2.2 Les types cellulaires impliqués	15
1.5.2.3 Les lymphocytes « natural killer » (NKs).....	15
1.5.2.4 Les lymphocytes T (LT).....	15
1.5.2.5 Les granulocytes neutrophiles (Np).....	16
1.5.2.6 Les monocytes/macrophages.....	16
1.5.2.6.1 Les sous populations de monocytes/macrophages.....	16
1.5.2.6.2 Détection de SARS-CoV-2 dans les monocytes/macrophages	18
1.5.2.6.3 Effet de l'infection sur la répartition des monocytes/macrophages.....	19
1.5.2.6.4 Réponse inflammatoire des monocytes/macrophages au SARS-CoV-2	19
1.6 LES MODELES DE CULTURES PRIMAIRES POUR L'ETUDE DES INTERACTIONS INITIALES DU SARS-CoV-2 AVEC L'HOTE	20
1.7 LES VOIES DE DETECTION VIRALE LORS DE L'INFECTION PAR LE SARS-CoV-2.....	31
1.8 LA PERFUSION PULMONAIRE <i>EX-VIVO</i> (PPEV).....	35
1.8.1 <i>PPEV et reconditionnement pulmonaire</i>	35
1.8.2 <i>Impact clinique de la PPEV</i>	37
1.8.3 <i>Les effets biologiques de la PPEV</i>	37
1.8.4 <i>PPEV et traitements thérapeutiques</i>	38
1.8.4.1 Les lésions ischémiques.....	38
1.8.4.2 L'Organe infecté	39
2 PROBLEMATIQUE	40
3 RESULTATS :	43
3.1 MANUSCRIT N°1	43
3.2 MANUSCRIT N°2	62
3.3 MANUSCRIT N°3	99
4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	120
4.1 LES LIMITES DU MODELE « POUMON ENTIER ».....	120
4.2 LES LIMITES DU MODELE D'INFECTION DE CELLULES ISOLEES :	125
4.3 L'IMPLICATION DES MONOCYTES ET MACROPHAGES DANS LES PREMIERES ETAPES DE L'INFECTION	126
4.4 AMELIORATION DE LA PPEV	129
4.5 LES LIMITES DU SCRNA-SEQ.....	131
5 BIBLIOGRAPHIE :	134

1 INTRODUCTION

1.1 LE SARS-CoV-2

Au cours du 21^e siècle, plusieurs épidémies dûes à des coronavirus ont eu lieu. D'abord en 2002 avec l'émergence du SARS-CoV puis en 2012 avec le MERS-CoV. Ces deux virus induisent des pneumonies sévères chez les personnes infectées. Fin 2019, le SARS-CoV-2 a émergé à Wuhan en Chine avant de se disséminer avec une rapidité importante, créant une épidémie mondiale¹. Cette rapide dissémination a causé, dans la plupart des pays, la fermeture des frontières mais aussi l'instauration d'un confinement de la population plus ou moins strict. Ces confinements sont une réponse à la pression importante subie par les hôpitaux face à un fort afflux de personnes en détresse respiratoire². Le SARS-CoV-2 est alors devenu un enjeu majeur de santé publique au niveau mondial, le plaçant au premier plan de nombreuses recherches.

Le SARS-COV-2 est un betacoronavirus à ARN simple brin positif enveloppé composé i) de protéines structurales et ii) de protéines non-structurales (Nsp) et auxiliaires.

- i) Parmi les protéines structurales, on trouve la protéine d'enveloppe (E) ainsi que la protéine de membrane (M) nécessaires à l'assemblage viral. La protéine de la nucléocapside (N) a un rôle dans la structure et la transcription virale. La protéine M est également impliquée dans la pathogénèse virale en favorisant l'échappement au système immunitaire³. Enfin la protéine de spicule (S), composée de 2 sous-unités fonctionnelles S1 et S2, permet l'attachement et l'entrée du virus dans sa cellule cible⁴. Le diagnostic des personnes infectées repose sur la détection des protéines N, E et S par qPCR, par des tests de type ELISA ou de « lateral flow »^{5,6}.
- ii) Le virus est également composé de 16 Nsp et de 9 protéines auxiliaires participant aux mécanismes de réplication virale, à la virulence et à l'échappement au système immunitaire de l'hôte⁷⁻⁹.

La forte similarité génétique entre le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV¹⁰ ainsi que les données déjà publiées sur ce dernier, ont permis d'identifier l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) comme le récepteur membranaire principal du SARS-CoV-2⁴. Le SARS-CoV-2 se lie à la cellule cible en partie via l'attachement de sa protéine S avec ACE2. La protéine S est clivée de différentes manières pour faciliter l'entrée virale par attachement et fusion, soit à la membrane plasmique soit dans l'endosome, permettant le relargage de l'ARN dans le cytoplasme (voir le chapitre 1.3.1 pour compléments)^{11,12}. Une fois à l'intérieur de la cellule, le virus détourne la machinerie cellulaire pour répliquer son génome viral mais aussi produire les protéines nécessaires à la formation de nouveaux virions¹³. Ces nouveaux virions migrent à la surface de la cellule et sortent par exocytose¹⁴ (Figure 1).

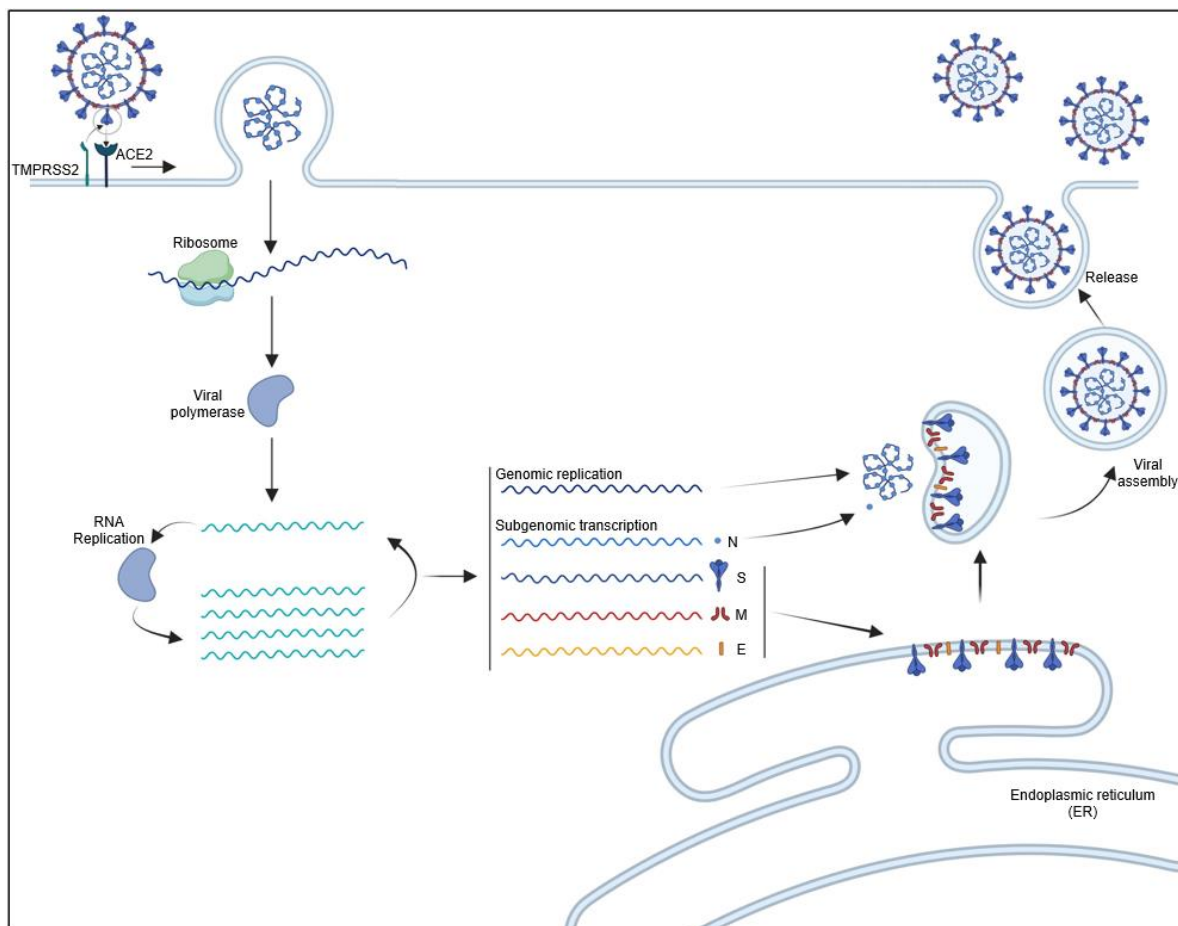


Figure 1. Cycle viral du SARS-CoV-2 (adapté de *Lebeau et al, 2020*¹⁵ et *Harrison et al, 2020*¹⁶): Le SARS-CoV-2 entre dans la cellule cible exprimant ACE2 et TMPRSS2 après fusion membranaire (le virus peut aussi entrer par endocytose en l'absence de TMPRSS2 par la voie de la cathepsine L voir figure 3. Les différents modes d'entrée du SARS-CoV-2). Une fois l'ARN viral dans le cytoplasme, il est traduit par le ribosome cellulaire permettant la synthèse de la polymérase virale. Cette polymérase permet la réplication du génome viral ainsi que la transcription d'ARN subgénomique codant pour les protéines structurales [nucléocapside (N), spicule (S), membrane (M), enveloppe (E)]. La traduction des protéines structurales virales S, E et M se fait dans le réticulum endoplasmique (ER) où elles vont s'insérer tandis que la N est traduite dans le cytoplasme. La N couplée au génome va se combiner aux protéines S, E et M formant un virion mature. Ces nouveaux virions migrent à la surface de la cellule et sortent par exocytose. Figure réalisée avec Biorender.

1.2 LES VARIANTS

Durant cette épidémie de SARS-CoV-2, de nombreux variants sont apparus. Ils présentent en général des mutations au niveau de la protéine S favorisant à la fois leur dissémination virale, mais également l'échappement au système immunitaire de l'hôte mis en place suite à une primo-infection ou par la vaccination. Dès le début de l'année 2020 est apparu un premier variant, le variant D614G dont la mutation consiste en un changement de l'aspartate en position 614 en une glycine dans la protéine S. Cette mutation confère au variant D614G un changement de conformation du domaine de liaison au récepteur (RBD) de la protéine S favorisant l'interaction avec le récepteur majeur ACE2. Elle confère également une plus grande stabilité de la forme clivée S1/S2 à la surface du virion. Ces deux propriétés donnent au variant un fort avantage répliatif. C'est ainsi que le variant D614G est devenu majoritaire à partir de Juin 2020¹⁸⁻²⁰. Au cours des mois suivants sont apparus divers variants : Alpha, Beta, Gamma, Delta et Omicron^{18,21}. Dans le cas du variant Alpha, des mutations à la fois de la protéine S mais également de la protéine N, de l'ORF9b et l'ORF6 lui permettent d'échapper plus facilement au système immunitaire inné^{22,23}. Les variants Beta et Gamma quant à eux échappent aux anticorps neutralisants par des mutations de la protéine S^{24,25}. Les deux plus récents variants devenus majoritaires au cours de l'année 2021, Delta et Omicron, ont été source d'inquiétude au niveau mondial en raison de leur avantage répliatif bien plus important que celui des

précédents variants et de leur capacité d'échappement au système immunitaire²⁶⁻²⁹. Les mutations du variant Omicron, bien que lui offrant un avantage répliatif important, l'ont également rendu moins pathogène en diminuant sa capacité fusogène comparé au variant Delta³⁰. Ainsi tous ces variants apparus au cours de l'épidémie participent à la dissémination virale malgré la mise en place d'une immunité collective via les infections et la vaccination de la population.

Durant nos travaux, nous avons utilisé des souches virales différentes : la souche initiale (Wuhan-like, WL, Institut Pasteur) et deux souches du variant D614G (souches D614G-a et D614G-b, M. Le Gouil).

1.3 LES RECEPTEURS PRESENTS CHEZ L'HOMME

La dynamique d'infection chez l'homme montre, dans les premiers temps de l'infection, un fort tropisme du virus au niveau de la cavité nasale puis pulmonaire et plus tardivement le tropisme devient multi-organes. En effet, l'autopsie de personnes décédées des suites de l'infection montre la détection de protéines virales du SARS-CoV-2 dans les poumons, le cœur, la trachée, les intestins, le foie, le pancréas, le cerveau et les reins^{31,32}. Les cellules ciliées sont une cible préférentielle, elles composent en grande majorité l'épithélium olfactif ce qui explique le fort tropisme viral pour la cavité nasale³³. Au niveau pulmonaire, les cellules ciliées ainsi que les cellules basales, les cellules clubs et les cellules alvéolaires de type 2 sont des cellules cibles du SARS-CoV-2^{31,34}. Le virus a également été retrouvé associé aux cellules endothéliales même s'il existe une controverse sur l'infection de celles-ci^{31,34-37}. Enfin, dans une étude où a été réalisé de l'hybridation *in situ* sur des coupes de poumons de patients décédés de l'infection par le SARS-CoV-2, de l'ARN viral a été retrouvé au niveau des macrophages alvéolaires (AMs) pulmonaires³⁵.

1.3.1 Le récepteur canonique – ACE2

Le récepteur principal du SARS-CoV-2, comme dans le cas du SARS-CoV, est le récepteur membranaire ACE2. L'expression de ce récepteur est ubiquitaire, on le retrouve exprimé dans différents tissus dont les poumons, les muqueuses orales et nasales, les reins, le cœur, les intestins, le pancréas, le cerveau ainsi qu'au niveau vasculaire³⁸. ACE2 a un rôle fondamental dans le système angiotensine-aldostérone qui est un régulateur majeur des fonctions cardiovasculaires (dont la pression artérielle), pulmonaires et rénales. Son expression est beaucoup plus importante au niveau des voies aériennes supérieures, puis elle diminue le long du tractus respiratoire pour être faiblement exprimée au niveau des voies aériennes basses³⁹. Ainsi, l'expression importante d'ACE2 associée à la forte densité de cellules cibles au niveau de la cavité nasale en font une voie d'entrée bien adaptée au SARS-CoV-2⁴⁰. Une hypothèse propose que la forte réplication virale ayant lieu dans la cavité nasale permettrait l'infection des voies aériennes basses, où l'expression d'ACE2 est moins forte, par la descente d'une forte dose virale le long du tractus respiratoire³⁹.

D'autres cofacteurs cellulaires sont nécessaires à l'entrée virale, ils sont impliqués dans le clivage de la protéine S nécessaire à la fusion membranaire. Le premier clivage a lieu lors de la biosynthèse et de la maturation du virus dans l'appareil de golgi des cellules infectées où la protéine S est clivée par la furine au niveau des sous-unités S1 et S2^{41-43(review)}. Puis, le second clivage a lieu après la liaison de la protéine S avec ACE2, par la protéase transmembranaire à sérine 2 (TMPRSS2), générant le site S2' ce qui va induire un changement conformationnel et activer pleinement le processus de fusion entre la membrane de la cellule cible et la membrane virale^{42,43(review)}. Lorsque TMPRSS2 n'est pas exprimée sur la cellule cible, le virus peut entrer par la voie endosomale dépendante de la clathrine, où le clivage sera réalisé par la cystéine-protéase cathepsine L, activant ainsi le processus de fusion cette fois entre la membrane de l'endosome et la membrane virale^{43(review)} (Figure 3).

1.3.2 Les récepteurs alternatifs

Le tropisme viral multi-tissulaire ainsi que la symptomatologie du COVID-19 ne correspondent pas toujours avec l'expression d'ACE2 suggérant l'existence d'autres récepteurs ou protéines membranaires accessoires favorisant l'entrée virale. Parmi ces récepteurs alternatifs, on trouve CD147, AXL, CD209L/L-SIGN/CLEC4M, CD209/DC-SIGN/CLEC4L, CLEC4G/LSECtin, ASGR1/CLEC4H1, LDLRAD3, TMEM30A, LRRC15, CD4, TMEM106B et KREMEN1. Je détaillerai ci-dessous les récepteurs alternatifs qui ont été les plus décrits (Figures 2 et 3).

CD169 (ou SIGLEC-1) est une lectine de type I reconnaissant les sucres membranaires de certains virus⁴⁴. Ce récepteur est exprimé notamment à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC) telles que les macrophages (MP) et les cellules dendritiques (DC). Dans le cas du SARS-CoV-2, la liaison du virus avec le CD169 se ferait par la reconnaissance de l'acide sialique membranaire et elle faciliterait la fusion ainsi que l'entrée virale dans la cellule, indépendamment de l'expression d'ACE2⁴⁵. Bien que ce récepteur permette l'entrée virale dans des MPs dérivés *in vitro* à partir de monocytes (Mo), il ne semble pas y avoir de production virale active mais seulement l'induction d'une réponse inflammatoire⁴⁵. Dans une autre étude, impliquant toujours des MPs dérivés *in vitro* à partir de Mos, la liaison du virus via le CD169 induit une forte réponse inflammatoire avec la production de facteur de necrose tumorale (TNF)- α , d'interleukine (IL)-6 et d'IL-1 β par la voie d'activation des senseurs RIG-1/MDA-5⁴⁴.

Cependant bien que ne permettant pas une infection productive, ce récepteur pourrait participer aux phénomènes de trans-infection. Ces derniers consistent en la liaison du virus par le CD169 pour ensuite l'amener aux cellules environnantes qui expriment ACE2 et favorisent ainsi l'infection des cellules cibles. Des études utilisant des cellules HEK 293T transfectées avec un plasmide codant pour CD169 ainsi que des DCs dérivées *in vitro* ont démontré l'implication de CD169 dans la trans-infection^{45,46}. Cependant, à ma connaissance il n'y a pas de résultats à ce jour montrant que les MPs exprimant CD169 puissent réaliser cette trans-infection.

Deux autres récepteurs de la famille des lectines, DC-SIGN et L-SIGN peuvent également participer à la dissémination virale. Ces deux récepteurs sont très exprimés au niveau des muqueuses respiratoires ainsi qu'au niveau de l'endothélium et de l'épithélium rénal sur la base d'immunomarquage de tissus humains^{47,48}. Elles peuvent spécifiquement interagir avec le domaine RBD de la protéine S du SARS-CoV-2 selon un mécanisme dépendant de la glycosylation⁴⁷. Cependant, cette interaction seule ne permet pas l'entrée virale. L'expression d'ACE2 est nécessaire pour qu'il y ait une infection productive^{47,48}. Ainsi, DC-SIGN et L-SIGN favorisent les phénomènes de cis-infection, en augmentant l'infection dépendante d'ACE2 sur la même cellule, mais également de trans-infection, en favorisant le transfert viral aux cellules permissives environnantes exprimant ACE2^{47,49}. De plus, le degré d'affinité de liaison entre le virus et DC-SIGN ou L-SIGN peut varier en fonction des capacités post-traductionnelles de glycosylation des différents types de cellules hôtes qui produisent les virus. En effet, le pattern de glycosylation de la protéine S, notamment le degré de production de structures richement mannosylées, augmente l'affinité avec DC-SIGN ou L-SIGN⁴⁹.

D'autres récepteurs que ceux appartenant à la famille des lectines sont également impliqués dans l'infection par SARS-CoV-2, c'est le cas de CD16, un récepteur de la fraction constante (FcR) gamma des immunoglobulines (Ig). Il est impliqué dans les phénomènes d'opsonisation virale et d'interaction avec les Mos et les MPs. Cette opsonisation du virus par les IgG et la liaison au CD16 va déclencher la voie de l'inflammasome, activant la caspase 1 et gasdermine D, et va induire *in fine* la mort cellulaire par pyroptose^{50,51}. Cette mort cellulaire est extrêmement inflammatoire avec le relargage de médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-1 β et l'IL-18⁵¹. Néanmoins, bien que permettant l'infection des Mos, l'infection via CD16 resterait abortive dans ces cellules⁵¹. De plus, il semble que les IgGs induites par la vaccination n'aient pas cet effet opsonisant pro-inflammatoire possiblement en lien avec le ratio fucose/galactose de l'IgG⁵¹.

NRP1 (ou BDCA4) est exprimée plus particulièrement sur les cellules épithéliales et endothéliales du système respiratoire et olfactif où l'expression d'ACE2 est relativement faible^{52(review)}. Elle est un co-récepteur de plusieurs facteurs de croissance facilitant de nombreux processus biologiques^{53,54}. NRP1 est exprimée par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) où son interaction avec le SARS-CoV-2 atténue l'induction de l'interferon (IFN) de type I (IFN-I)⁵⁵. Lors du cycle répliatif du SARS-CoV-2, la protéine S est clivée par la furine au niveau des cellules productrices sur le site S1/S2 permettant l'interaction du virus avec NRP1⁵⁶. Cependant, NRP1 seule ne permet pas l'entrée virale dans les cellules^{56,57}. En effet, l'expression combinée d'ACE2 et de NRP1 est nécessaire à l'infection et NRP1 favorise la rencontre du virus avec ACE2 et TMPRSS2⁵⁷.

LRRC15, une protéine membranaire riche en répétition leucine, est apparue récemment comme étant impliquée dans l'infection virale. Elle est particulièrement exprimée au niveau pulmonaire sur les cellules endothéliales et les fibroblastes. De plus, son expression est augmentée chez les patients infectés⁵⁸. Cette protéine se lie à la protéine S du virus. Elle ne permet pas l'entrée virale à elle seule, mais elle module l'infection⁵⁸. Lorsqu'elle est surexprimée en cellules épithéliales (CALU-3), LRRC15 promeut l'infection⁵⁸. Par contre, le LRRC15 présent à la surface de fibroblaste permet la séquestration du virus empêchant ainsi l'infection des cellules permissives alentours⁵⁹. De plus, la liaison du LRRC15 permettrait d'activer la réponse antifibrotique ce qui protégerait les individus de l'apparition de fibrose pulmonaire observée chez les patients COVID-19 long⁵⁹.

Enfin CD147, une glycoprotéine transmembranaire dont l'expression est retrouvée dans les poumons, les reins et le cœur, serait également impliquée dans l'infection cellulaire^{60(review)}. Ce récepteur est connu pour être un médiateur de l'infection de certains pathogènes comme le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) mais également du SARS-CoV^{61,62}. De plus, chez des patients infectés par le SARS-CoV-2, on

détecte des virions dans les lymphocytes pulmonaires qui expriment CD147 et pas ACE2⁶³. Des analyses *in silico* ont montré qu'une interaction serait possible entre CD147 et la région RBD de la protéine S du SARS-CoV-2⁶⁴. Cependant, lorsque l'expression de CD147 est abrogée dans des cellules humaines pulmonaires il n'y a aucun effet visible sur la sensibilité à l'infection, suggérant que CD147 n'est pas impliqué directement dans le processus infectieux⁶⁵. Cependant cette conclusion est contredite par d'autres études qui montrent que l'expression de CD147 dans des lignées cellulaires exprimant peu ACE2 est suffisante pour permettre l'entrée virale⁶³.

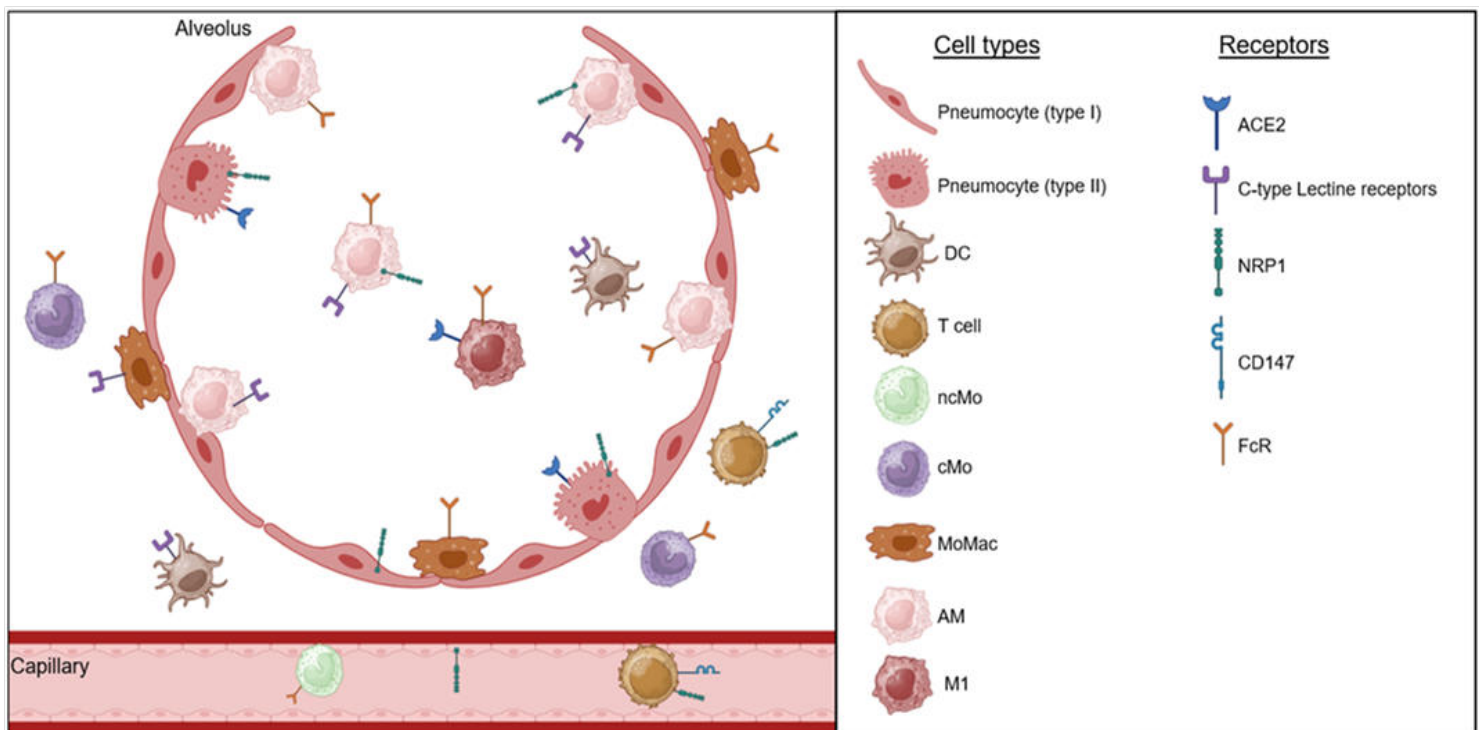


Figure 2. Expression des différents récepteurs impliqués dans l'entrée du SARS-CoV-2 au niveau alvéolaire :

Expression cellulaire des différents récepteurs canoniques ou alternatifs impliqués dans l'entrée virale au niveau de différents types cellulaires présents dans l'alvéole. ACE2, le récepteur principal au virus est exprimé majoritairement par les pneumocytes de type II et également par des macrophages pro-inflammatoires M1. Il existe également d'autres récepteurs impliqués dans l'infection virale : i) les récepteurs des Lectines de type C (CD169, DC- et L-SIGN) exprimés par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) ii) CD147 exprimé à la surface des lymphocytes T (LT) iii) NRP1 exprimé particulièrement sur les cellules épithéliales et endothéliales, les macrophages alvéolaires (AM) et les LTs et iv) le FcR exprimé par des macrophages pro-inflammatoires de type M1. Figure réalisée avec Biorender.

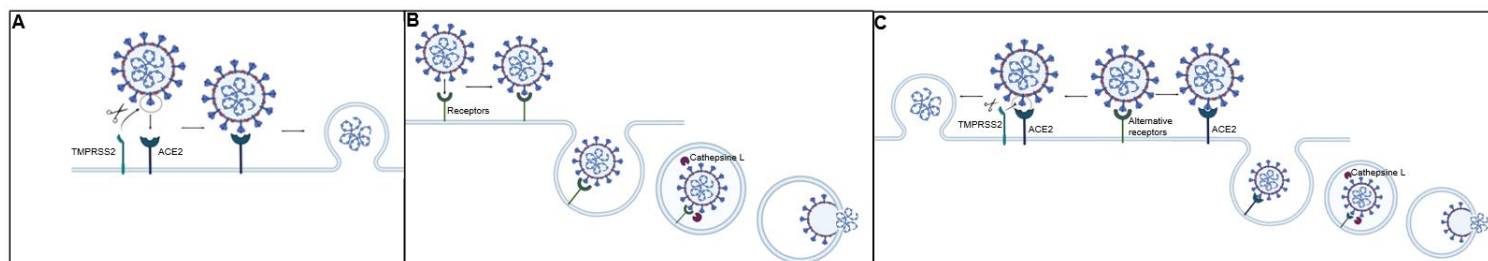


Figure 3. Les différents modes d'entrée du SARS-CoV-2 : (A) La protéine de Spicule (S) est initialement clivée par la furine en S1/S2 lors de sa production par la cellule infectée. Le complexe S1/S2 se lie au récepteur ACE2, ce qui permet le clivage de S2 par la sérine-protéase TMPRSS2 générant le site S2'. Cela induit un changement conformationnel et permet le processus de fusion entre la membrane de la cellule cible et la membrane virale. (B) En l'absence de TMPRSS2, la protéine S se lie à ACE2 ou à un récepteur alternatif. Le virus va être endocyté puis clivé par la cystéine-protéase cathepsine L au niveau de la protéine S activant le processus de fusion entre la membrane de l'endosome et la membrane virale. (C) La protéine S se lie à un récepteur alternatif qui peut soit favoriser la transmission à ACE2 et permettre son entrée suite au clivage par TMPRSS2 ou permettre son endocytose et son clivage par la cathepsine L permettant la fusion membranaire. Figure réalisée avec Biorender.

1.4 LA MALADIE INDUITE CHEZ L'HOMME

La transmission du SARS-CoV-2 peut se faire directement entre individus, par la production de gouttelettes chargées en virus, et également de manière indirecte par la présence de virus en suspension dans l'air ou sur des surfaces inertes^{66,67}. On estime que le taux de reproduction initial (R_0) du SARS-CoV-2 se situe entre 2 et 2.5, c'est-à-dire qu'une personne malade infecte entre 2 et 2.5 personnes⁶⁶.

Les symptômes apparaissent 2 à 14 jours suivant l'infection. Certains individus, environ 40%⁶⁸, sont asymptomatiques et participent à la dissémination virale^{66,67,69}. Chez les personnes symptomatiques, il existe 3 degrés de sévérité à l'infection : léger, modéré ou sévère/critique. Les manifestations cliniques les plus communes des cas légers et modérés sont : fièvre, toux, frissons, maux de tête, perte du goût et d'odorat, maux de gorge, nez bouché, diarrhées, myalgies, essoufflement et parfois des problèmes

respiratoires avec le développement d'une pneumonie plus ou moins grave^{66,70,71}. Les cas sévères/critiques, qui ont concerné près de 20% des personnes infectées en 2020⁷², présentent des symptômes qui dégénèrent au cours de l'infection en une détresse respiratoire importante allant jusqu'au syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA), une tempête cytokinique, des thromboses, une détresse multi-organes touchant le cœur, les reins et le foie et parfois en une septicémie avec choc septique^{66,67,70,73}. La sévérité de l'infection diffère d'un individu à l'autre en fonction de son âge, son sexe, sa génétique, l'état de son système immunitaire et en fonction de la présence de comorbidités⁷³. Ainsi, les personnes âgées sont les plus sensibles à l'infection et ont tendance à développer un COVID-19 sévère. De plus, la présence de comorbidités telles que l'obésité, le diabète, les pathologies chroniques au niveau des reins et des poumons (par exemple la bronchopneumonie chronique obstructive, BPCO), le cancer et les traitements immunosuppresseurs augmentent la probabilité de développer une forme sévère de l'infection^{73,74}.

Le compartiment respiratoire, compartiment d'intérêt dans notre étude, est concerné par tous les degrés de sévérité⁷³. Les cas légers présentent une infection du tractus respiratoire haut avec de la toux et des maux de gorge, les cas modérés présentent des essoufflements ainsi que des pneumonies nécessitant parfois une hospitalisation tandis que les cas sévères/critiques développent un SDRA^{67,73}. L'apparition du SDRA pourrait être lié directement ou indirectement au virus. En effet, le virus peut agir directement en induisant la mort des cellules alvéolaires ainsi que la diminution de la production de surfactant créant ainsi une tension pulmonaire. Il peut agir indirectement par la mise en place de la tempête cytokinique induisant une détresse multi-organes^{73,75}. Lorsque les manifestations cliniques touchent le compartiment pulmonaire, les cas sont alors considérés très critiques et les chances de survie de l'individu diminuent drastiquement⁷³. Dans les cas de détresse multi-organes, le système cardiovasculaire, ophthalmique, neurologique, foetal, gastro-intestinal et rénal sont touchés expliquant l'observation d'une défaillance multi-organes. Il s'agit d'une des causes les plus

communes du décès induit par l'infection⁷⁴.

1.5 LA PHYSIOPATHOLOGIE CELLULAIRE

1.5.1 Le rôle des interférons de type I et III dans l'immunopathologie

La réponse IFN-I et -III semble jouer un rôle majeur dans l'immunopathologie de l'infection par le SARS-CoV-2. Dans les formes légères et modérées, on observe une réponse précoce et robuste d'IFN-I et -III, notamment dans le nasopharynx⁷⁶. Dans les formes sévères, la réponse IFN initiale est déficiente, elle se trouve décalée dans le temps et persiste aux temps tardifs, en lien avec le développement d'un syndrome inflammatoire généralisé⁷⁷⁻⁷⁹.

Ces réponses IFN-I et -III inappropriées peuvent résulter i) de la réponse inadaptée de l'hôte et/ou ii) de mécanismes viraux d'échappement au système immunitaire. Concernant la réponse inadaptée de l'hôte, des études génétiques ont montré que des patients développant des formes sévères présentaient des mutations congénitales dans les gènes codant pour le récepteur toll-like (TLR) 3, TLR7 et UNC93B1, ces mutations conduisant à un défaut de production d'IFN- β . Par ailleurs, environ 10 % des patients avec des formes sévères présentent des auto-anticorps neutralisants dirigés contre l'IFN-I qui sont déjà présents en amont de l'infection et qui inhibent la réponse innée protectrice⁸⁰. Concernant les mécanismes viraux d'échappement rapportés dans des revues générales récentes^{81,82}, ils font intervenir des protéines virales structurales, non-structurales ou accessoires interférant sur les voies de détection virale. Ces voies regroupent, entre autres, les voies MDA5, RIG-I, LGP2 et TLR, qui sont impliquées dans l'induction de l'expression d'IFN-I et -III et la réponse innée^{83,84}. Ainsi, Nsp15 par son activité endonucléase détruit l'ARN double brin viral, réduisant ainsi la détection par l'hôte. Nsp13 et Nsp14 inhibent l'expression du récepteur d'interféron alpha/beta 1 (IFNAR1). Nsp13 ainsi que la protéine S interagissent avec STAT1 bloquant l'activation de la cascade de signalisation IFN tandis que Nsp1, Nsp10 et Nsp14 inhibent l'induction des gènes stimulés par l'interféron (ISG). Nsp1, Nsp9, Nsp15, ORF6 et la protéine M

interagissent avec la machinerie de transport nucléaire empêchant l'ARN messager (ARNm) codant pour l'IFN-I de passer dans le cytoplasme. Nsp1, en bloquant l'entrée de l'ARNm dans le ribosome, réduit ainsi la traduction des IFNs. NSP10, NSP14 et NSP16 peuvent également bloquer la traduction des protéines de l'hôte lors de l'infection^{81,82}. La protéine M, en se liant à MAVS, bloque la phosphorylation d'IRF3 et de TBK1, inhibant ainsi la voie d'induction de l'IFN-I⁸⁵. Le rôle de la protéine N est ambigu : aux temps précoces où N est faiblement exprimée, elle inhibe la signalisation IFN-I, tandis qu'aux temps tardifs où la protéine N est fortement exprimée, elle favoriserait la signalisation IFN-I ainsi que la production de cytokines inflammatoires⁸⁶.

Cette inhibition de la voie IFN-I et -III, par ces différents facteurs viraux exprimés précocement lors de l'entrée dans les cellules, favorise une réplication virale massive. L'hypothèse qui est alors proposée est que la forte charge virale qui en découle va stimuler les cellules de l'immunité innée qui vont alors produire de l'IFN-I et -III de manière exagérée et décalée dans le temps, conduisant à un recrutement massif de cellules inflammatoires et hyper-réactives, génératrices d'une réponse inflammatoire exacerbée⁸⁷.

1.5.2 Le syndrome inflammatoire associé à l'infection par le SARS-Cov-2 et les types cellulaires impliqués

1.5.2.1 Les molécules de l'inflammation

L'ensemble des études sur la physiopathologie de l'infection montre que la gravité est associée à une réponse inflammatoire qui n'est pas corrélée à la charge virale⁸⁸. Les cas sévères présentent des taux élevés d'IL-6, IL-1, IL-8, IFN- γ , de TNF et MCP-1⁸⁹. Le complément serait aussi impliqué⁸⁹. En effet, l'analyse par immunohistochimie de tissus pulmonaires de patients décédés montre une accumulation des composants du complément dans les espaces alvéolaires⁹⁰. De plus, l'analyse plasmatique de patients exprimant des formes modérées et/ou sévères montre une élévation du taux de C5a⁹¹.

Une activation dérégulée du complément peut induire des inflammations chroniques, une dysfonction des cellules endothéliales et une coagulation intravasculaire potentiellement mortelle.

1.5.2.2 Les types cellulaires impliqués

Les lymphocytes « natural killer » (NK), les lymphocytes T (LT), les neutrophiles (Np), les monocytes (Mo), et les macrophages (MP) ont un rôle dans la mise en place de la tempête cytokinique dans les formes sévères.

1.5.2.3 Les lymphocytes « natural killer » (NKs)

Il a été montré que les NKs sont capables de neutraliser le virus par la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et d'exercer une activité antivirale par l'augmentation de l'expression d'IFN- γ et de CXCL2^{92,93}. Cependant, le virus, via son ORF8, diminue l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I) des cellules infectées inhibant ainsi la lyse par les cellules NKs⁹⁴. Des analyses de RNA-seq sur cellule unique (scRNAseq) de lavages broncho-alvéolaires (BAL) de patients sévères montrent une augmentation des cellules NKs dans les poumons. Cette augmentation est associée à un taux élevé de chimiokines impliquées dans leur recrutement^{95,96} qui conduit à des dommages tissulaires⁹⁶. Par ailleurs, d'autres études mettent en évidence un phénotype anergique des NKs qui pourrait être lié à l'inflammation persistante^{97,98}.

1.5.2.4 Les lymphocytes T (LT)

Lors de l'infection, on note une lymphopénie à LTs dans les formes sévères qui pourrait être consécutive à la séquestration des LTs dans le compartiment pulmonaire⁹⁹. En effet, des analyses transcriptomiques réalisées sur des BALs de patients en détresse respiratoire montrent un enrichissement en LTs¹⁰⁰. Ces cellules semblent être dirigées contre la protéine S et produisent majoritairement des cytokines effectrices de type

Th1¹⁰¹. Ces LTs seraient recrutés par la production de chemoattractants produits par les AMs infectés¹⁰⁰. Ces LTs sécrètent de l'IFN- γ activant les AMs et d'autres cellules immunes. Cette boucle d'activation participerait ainsi à l'apparition d'alvéolites pulmonaires¹⁰⁰.

1.5.2.5 Les granulocytes neutrophiles (Np)

Lors de l'infection, les Nps vont libérer diverses molécules toxiques suite à leurs dégranulations et également former des pièges extracellulaires dérivés des neutrophiles (NETs) formés par des réseaux de fibres extracellulaires, notamment de l'ADN, capables de se lier aux pathogènes et les neutraliser.

Ces derniers sont relargués lors de la pyroptose de la cellule, conduisant ainsi à l'inactivation du virus. Des marqueurs de « netose » ont été identifiés dans le sang de patients et semblent être associés à la sévérité de l'infection¹⁰². Les NETs peuvent interagir avec les plaquettes, le complément et les facteurs de coagulation et ainsi participer aux phénomènes d'hyper-inflammation et de thrombose rencontrés dans les infections sévères. De plus, les FcRs exprimés par les Nps vont lier les IgGs générées lors de l'infection (auto-anticorps anti-cytokines, anti-acides nucléiques, anti-virus). Cette liaison pourrait participer à une boucle d'amplification d'activation cellulaire, participant aux phénomènes d'hyper-inflammation⁸⁹.

1.5.2.6 Les monocytes/macrophages

De nombreuses études mettent en avant le rôle de différentes populations de monocytes/macrophages dans la physiopathologie de l'infection et le syndrome inflammatoire. Il s'agit d'une population cellulaire complexe. Je vais d'abord présenter les différents types de monocytes/macrophages dans le poumon et le sang, puis leur implication dans l'infection en fonction de la sévérité.

1.5.2.6.1 Les sous populations de monocytes/macrophages

Dans le poumon, organe cible majeur du virus, on trouve les AMs, les macrophages interstitiels (IM) et les 3 populations de monocytes, i.e. les monocytes classiques (cM~~16~~

non classiques (ncMo) et intermédiaires (iMo). Ces populations seront particulièrement concernées par le travail expérimental de cette thèse. Les AMs (phénotype chez l'homme : $CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{hi}CD14^{lo}CD163^{hi}CD169^{hi}$)¹⁰³⁻¹⁰⁶ sont les gardiens de l'homéostasie de l'arbre respiratoire. Ils sont localisés dans la lumière alvéolaire et catabolisent le surfactant et les cellules mortes. Ils sont capables de détruire les pathogènes et exercent principalement un rôle anti-inflammatoire, réparateur et protecteur¹⁰⁷. Ils sont issus, au moins chez la souris, de progéniteurs provenant du foie foetal et du sac vitellin¹⁰⁷. Les IMs (phénotype chez l'homme : $CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{int}CD14^{pos}CD163^{int}CD169^{neg}$)¹⁰³⁻¹⁰⁶ sont issus de progéniteurs médullaires et sont localisés dans l'espace entre les vaisseaux sanguins et l'alvéole. Ils représentent une autre ligne de protection contre les agressions et sont anti- ou pro-inflammatoire en fonction du contexte. Leur phénotype et transcriptome partagés avec les monocytes expliquent qu'on les appelle également « macrophages dérivés des monocytes » (MoMacs)¹⁰⁸⁻¹¹⁰ (Figure 4). Les cMos ($CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{neg}CD14^{pos}CD16^{lo}$) sont fortement recrutés lors d'inflammations, les ncMos ($CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{neg}CD14^{lo}CD16^{pos}$) contrôlent l'intégrité des vaisseaux (appelés patrouilleurs) et les iMos ($CD14^{pos}CD16^{pos}$) sont encore énigmatiques, ils partagent une grande partie de leur transcriptome avec les ncMos et ont des propriétés de présentation antigénique¹¹¹⁻¹¹³.

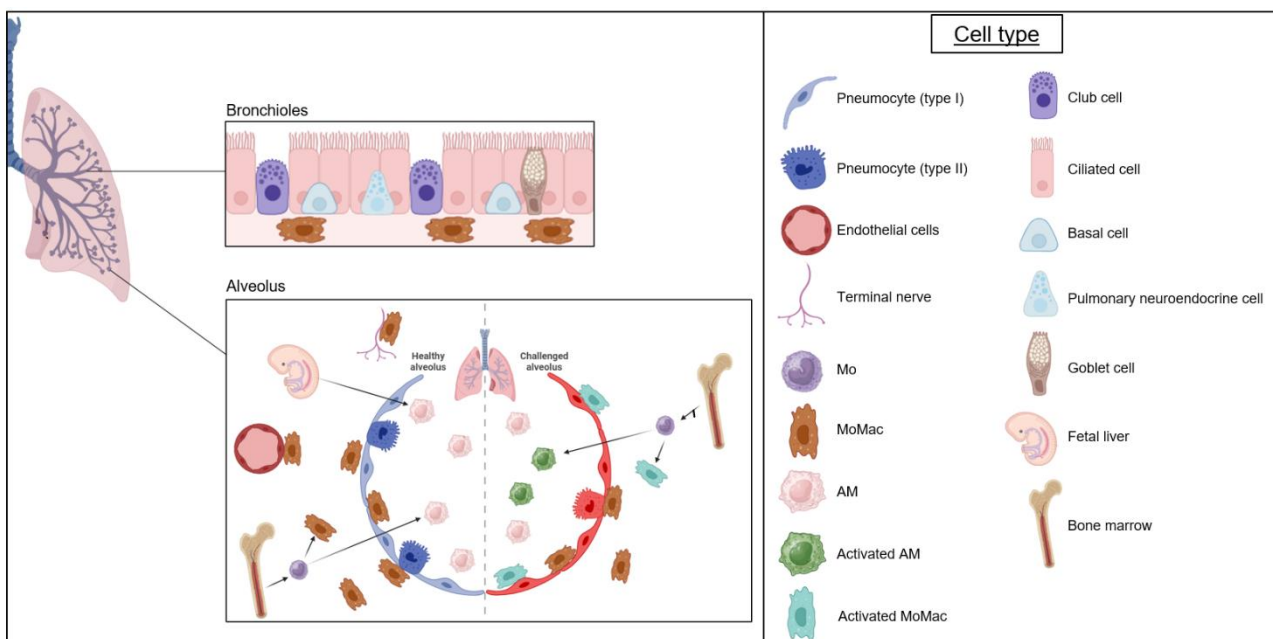


Figure 4. Origine des macrophages alvéolaires (AMs) et les macrophages dérivés des monocytes (MoMacs) au niveau pulmonaire (adapté de Shi et al, 2021¹¹⁴ et Heinen et al, 2021¹¹⁵) : En condition homéostatique, l'alvéole est composée de cellules épithéliales (pneumocytes de type I et II). Les voies aériennes (bronches, bronchioles) comportent des cellules épithéliales basales, sécrétoires (Club/Goblet) et multi-ciliées. Les AMs dits résidents, population macrophagique majoritaire de l'alvéole, dérivent de précurseurs embryonnaires et sont capables d'auto-renouvellement, et des monocytes (Mo) peuvent aussi donner naissance à des AMs ressemblant fortement aux AMs résidents. Dans différents compartiments du parenchyme, il existe des populations de macrophages interstitiels (IMs), qui dérivent des Mos et qui sont semblables aux macrophages dérivés des monocytes (MoMacs) de la peau du coeur et de l'intestin¹¹⁶. On trouve ces populations de IMs, que nous appellerons MoMacs dans ce travail, dans différentes niches: sous les cellules épithéliales des bronches/bronchioles^{116,117}, dans les septa des alvéoles chez l'homme¹⁰⁶, proches des cellules endothéliales et de terminaison nerveuses¹¹⁸, et aussi dans la lumière alvéolaire¹¹⁹. Ces diverses populations de macrophages (MPs) sont impliquées dans différentes fonctions, notamment d'élimination du surfactant, de cellules mortes et de réparation (AMs), d'immunoregulation (MoMacs) ou de présentation antigénique (AMs and MoMacs). AMs et MoMacs exercent des fonctions de capture d'antigènes et pathogènes depuis les compartiments aériens^{116,117}. Lors d'infection, de profondes perturbations modifient les populations de MPs pulmonaires, avec un recrutement important de monocytes donnant naissance à des MoMacs et aussi des AMs, qui revêtent des profils inflammatoires^{114,120,121}. Figure réalisée avec Biorender.

1.5.2.6.2 Détection de SARS-CoV-2 dans les monocytes/macrophages

Des protéines virales et de l'ARN viral ont été détectés en quantité importante dans les AMs de patients, notamment dans les MPs des BALs¹²² et dans des tissus d'autopsie¹²³. La plupart des articles montrent que le SARS-CoV-2 n'est pas capable d'un cycle productif dans les MPs^{44,124-128} mais certains articles montrent qu'une production serait possible¹²⁹⁻¹³¹. Les MPs infectés maintiennent leur viabilité¹³¹ ou montrent une mortalité¹²⁷. Plusieurs études montrent également que l'exposition des monocytes/macrophages au SARS-CoV-2 déclenche la synthèse de cytokines inflammatoires^{124,127,132} tandis que d'autres rapportent le contraire¹³³⁻¹³⁵. Toutefois, la plupart des articles étudiant la réplication virale, les réponses inflammatoires et la mortalité des cellules infectées concernent des MPs dérivés *in vitro* à partir de Mos, qui sont possiblement différents des MPs des muqueuses respiratoires dans leur permissivité, sensibilité et réponse au virus. Ainsi, les résultats peuvent fortement dépendre de l'origine des cellules et des conditions de culture. Ces cellules pourraient aussi être impliquées dans les phénomènes de trans-infection comme vu dans la partie 1.3.2 de l'introduction.

1.5.2.6.3 Effet de l'infection sur la répartition des monocytes/macrophages

Dans les formes légères, les patients présentent une expansion des iMos dans le sang et une faible représentation de cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC)⁷⁶. Dans les formes graves, on observe une forte accumulation sanguine de cMos, exprimant faiblement le MHC de classe II (MHC-II), qui présentent des fonctions MDSC ainsi qu'une réduction des DCs et des iMos. Dans le poumon, on observe alors une déplétion des AMs résidents au profit des MoMacs (SPP1pos) et des iMos présentant un profil inflammatoire^{76,88,136-138}. Ainsi, la composition du compartiment monocytes/macrophages apparaît impactée par l'infection.

1.5.2.6.4 Réponse inflammatoire des monocytes/macrophages au SARS-CoV-2

Dans les formes sévères, les BALs montrent que les MPs présentent un défaut de réponse IFN-I et une production de cytokines exacerbée^{89,139} avec expression de l'IL-6, TNF- α , IL-10, IL-1 β , CCL4 et CXCL10 conduisant au recrutement de LTs activés inducteurs d'alvéolite¹⁰⁰. Les réponses des MPs au SARS-CoV-2 ont été étudiées principalement *in vitro*, essentiellement à partir de cultures de Mos sanguins dérivés en MPs. Ainsi, l'infection de MPs dérivés *in vitro* induit la synthèse d'IL-1 β , IL-6, IL-10, de TNF- α et CXCL10 ainsi qu'une réponse faible d'IFN-I^{127,132}. L'induction de l'expression des cytokines dans des MPs dérivés *in vitro* fait intervenir la protéine MAVS qui s'associe à l'ARN viral génomique et subgénomique suite à la réplication partielle du virus (abortive)⁴⁴, comme expliqué plus haut. Par ailleurs, l'infection *ex vivo* de Mos induit un changement métabolique en faveur de la glycolyse qui promeut la réplication virale et la production cytokinique¹⁴⁰. Enfin, environ 10% des iMos et ncMos (CD16+) dans le sang et le poumon de patients contiennent des protéines virales du SARS-CoV-2 associées à l'activation de l'inflammasome (SPECK^{POS}), ce qui conduit à la mort cellulaire par pyroptose⁵¹. L'infection de ces cellules se fait via les FcRs des IgG (CD16 et CD64), elle est abortive et participerait à l'inflammation systémique observée dans les cas sévères⁵¹.

Au total, les travaux publiés montrent que les monocytes/macrophages sont fortement impliqués dans la pathogénie de l'infection. Cependant, l'implication relative des différentes populations de monocytes/macrophages du poumon, qui diffèrent de par leur ontogénie et fonction, n'a pas été étudiée à notre connaissance.

1.6 LES MODELES DE CULTURES PRIMAIRES POUR L'ETUDE DES INTERACTIONS INITIALES DU SARS-CoV-2 AVEC L'HOTE

La compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'infection par le SARS-CoV-2, comprenant la réponse innée anti-virale, nécessite d'étudier les premières étapes des interactions entre virus et hôte au site de primo-infection, et ceci dans des modèles les plus pertinents possibles. De nombreux travaux ont été conduits avec des lignées cellulaires épithéliales immortalisées telles des cellules VEROE6 ou CALU-3, cependant ces types cellulaires modèles sont bien éloignés des cellules cibles du virus et ne reproduisent pas la complexité des tissus. Par ailleurs, des modèles animaux ont été utilisés, tels que les souris transgéniques pour ACE2^{141,142}, des souris humanisées^{143,144}, des primates non-humains^{145,146}, des furets^{147,148} et des hamsters^{149,150}. Ces modèles animaux ont apporté beaucoup d'informations sur les types cellulaires impliqués dans l'infection, sur la nature et la régulation de la réponse innée dans la complexité tissulaire des voies respiratoires hautes et basses, et ont permis d'explorer des stratégies prophylactiques et thérapeutiques. Toutefois, ces modèles sont différents de l'hôte majeur qu'est l'Homme et ont donc leurs limites en raison des spécificités d'espèces qui conditionnent et régulent le cycle viral, l'expression des récepteurs au virus, les mécanismes d'échappement viral à la réponse de l'hôte, les réponses inflammatoires, les types cellulaires en jeu etc. Par exemple, les modèles primates non humains (comme le macaque et le singe vert), malgré une expression comparable des récepteurs et une bonne réplication virale¹⁵¹, ne reproduisent pas la forme sévère du COVID-19, et il se pourrait que des différences de réponses innées entre Homme et singe soient impliquées.

Il n'est pas possible d'étudier directement les premières phases de l'infection par le SARS-COV-2 chez l'Homme dans les tissus. Des infections expérimentales ont pourtant été conduites directement chez l'Homme, mais l'accès aux tissus a été limité¹⁵². Pour se rapprocher des conditions « naturelles » de l'infection, des modèles de cultures primaires *in vitro* ont été employés. Ces modèles incluent des cultures primaires de cellules épithéliales du tractus respiratoire en interface air-liquide (ALI), des organoïdes, des « poumon-sur-lame », des explants pulmonaires, des sections fines de tissu pulmonaire vivant (PCLS), des AMs issus de BAL et des MPs dérivés *in vitro* de Mos. Je présente rapidement ci-après ces différents modèles :

- les cellules en culture ALI : des cellules primaires épithéliales humaines du nez, de la trachée et des bronches peuvent être cultivées et différenciées en condition ALI c'est-à-dire que la surface apicale des cellules est en contact avec l'air, tandis que la surface basale est en contact avec du milieu de culture. Cette méthode permet la formation d'un épithélium pseudostratifié composé de différents types cellulaires tels que les cellules ciliées, goblets, clubs et basales et dont l'organisation cellulaire est proche de l'épithélium respiratoire *in vivo*^{115(review)}.

- les organoïdes : il s'agit de structures cellulaires complexes en trois dimensions qui miment l'architecture de l'organe entier. Les organoïdes sont dérivés à partir de cellules souches pluripotentes induites ou de cellules souches adultes, qui poussent sur une matrice extracellulaire de support afin de mimer les composés de la membrane basale^{115(review)}. Ce système complexe est composé de plusieurs types cellulaires et capable de reproduire certaines fonctions spécifiques de l'organe. Plusieurs structures d'organes ont ainsi pu être modélisées grâce aux organoïdes dont le poumon¹⁵³, le rein¹⁵⁴, l'intestin¹⁵⁵ et même le cerveau¹⁵⁶.

- les « poumon sur lame » ou « lung-on-a-chip » : ce modèle complexe est composé de cellules épithéliales pulmonaires et de cellules endothéliales se trouvant de part et d'autre d'une membrane poreuse permettant les échanges. La culture de ce système est en ALI, les cellules épithéliales sont en contact avec l'air, tandis que les cellules endothéliales sont en contact avec un flux constant de milieu de culture afin

de mimer la circulation sanguine. De plus, un flux d'air latéral permet d'induire une élongation des cellules épithéliales pour se rapprocher au mieux des mouvements induits lors de la respiration^{115(review)}.

- les explants issus de poumon humain : ils ont beaucoup été utilisés afin d'étudier les interactions avec les virus car c'est un modèle simple à mettre en place¹¹⁵. De petits fragments pulmonaires sont découpés à partir de résections chirurgicales de cancer, en choisissant des zones éloignées de la tumeur. Cependant, en fonction des études, on note une différence dans les conditions de traitements des fragments que ce soit sur l'utilisation de matériel frais ou congelé ou encore sur les méthodes d'infection (durée, dose, simple incubation ou injection intra-tissu).

- les PCLS : elles sont préparées sous forme de tranches de 100-200µm avec un microtome après avoir solidifié le tissu avec de l'agarose^{157(review)}. Elles sont mieux calibrées et théoriquement mieux adaptées à la culture cellulaire que les explants. L'avantage des explants et des PCLS réside dans leurs compositions cellulaires qui incluent l'ensemble des différents types cellulaires du poumon i.e. les cellules épithéliales, mésenchymateuses et immunitaires, ce qui n'est pas le cas des cultures en ALI et des organoïdes.

Les résultats de différentes études des interactions entre le SARS-CoV-2 et les cultures *in vitro* utilisant ces modèles sont présentés sous la forme du tableau 1 ci-dessous. En comparant les cellules cibles et les réponses induites par l'infection, on peut voir que les résultats divergent entre des études utilisant les mêmes modèles ou des modèles différents. Ainsi, la culture de cellules endothéliales montre une infection abortive (ligne 5 du Tableau 1), tandis qu'un modèle de « poumon-sur-lame » montre le contraire (ligne 21). Les cultures épithéliales ALI révèlent soit que tous les types épithéliaux peuvent être infectés (ligne 2) soit que les cellules ciliées sont des cibles privilégiées (ligne 1), ce que semble corroborer des études sur des patients décédés¹⁵⁸. D'autre part, une étude sur des PCLS montre que les cellules épithéliales sont les cibles

principales (ligne 29), alors qu'une autre étude avec le même modèle montre que les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires sont infectés à des niveaux comparables (ligne 27). Enfin sur des explants de poumon, les AMs se sont révélés être les cibles principales (ligne 22). Dans le cas des AMs pulmonaires, des études montrent une infection productive de ces cellules (lignes 9 et 16) alors que d'autres montrent le contraire (lignes 8 et 10). Il existe également des divergences sur les réponses inflammatoires notamment sur la réponse IFN qui semble être induite lors de la culture de cellules épithéliales en ALI (ligne 2) mais qui ne l'est pas dans le cas d'explants pulmonaires (ligne 26).

Au total, l'ensemble des travaux publiés utilisant des modèles de cultures primaires *in vitro* ne donne pas de conclusion univoque sur les cibles majeures du virus, la réplication virale et la réponse cellulaire. Les raisons des différences peuvent être liées à des difficultés d'harmonisation entre les études, la variabilité inter-donneur de tissus, les souches virales utilisées, mais aussi les biais inhérents à ces modèles tels que leur composition en cellules ou l'architecture tissulaire modifiée par rapport au contexte naturel. En effet, bien que tous ces modèles *in vitro* aient servi à la compréhension de l'infection pulmonaire par le SARS-CoV-2, aucun ne reproduit l'architecture macro- et micro-anatomique du tissu ce qui pourrait biaiser les résultats et potentiellement expliquer certains résultats incohérents de la littérature. Nous avons décidé d'évaluer un modèle novateur d'infection de poumon entier en tirant partie de la technique de perfusion pulmonaire ex-vivo (PPEV), qui est utilisée classiquement en clinique avant la transplantation et permet le maintien en vie de l'organe. Nous avons utilisé cette technique dans le but d'identifier les cellules cibles du virus dans le contexte de l'infection du poumon entier et d'analyser les réponses cellulaires mises en place aux temps précoces de l'infection.

Modèle d'étude	Souche(s) virale(s) utilisée(s)	Méthode d'infection	Types cellulaires infectés	Effets inflammatoires	Ligne	Références – PMID/DOI
Cellules épithéliales bronchiques – Culture ALI	SARS-CoV-2 isolat 026V-03883	Infection pendant 2h à 1000 TCID ₅₀ /ml suivie d'un lavage. Maintien en ALI avec du milieu frais.	Infection des cellules ciliées du côté apical avec une réplication active		1	32434888
Cellules épithéliales bronchiques – Culture ALI	SARS-CoV-2 isolat USA-WA1/2020	Infection pendant 1h à MOI 0.01. Maintien en culture ALI avec du milieu frais	Infection des cellules ciliées, des cellules basales, des cellules clubs et des cellules intermédiaires basales/clubs	Induction robuste IFN-I et -III avec réponse décalée d'IFN-β1. Induction d'ISGs, de cytokines et chimiokines inflammatoires dont l'IL-6	2	33730024
Cellules épithéliales bronchiques	SARS-CoV-2 WT : hCoV-19/Hong Kong/WHV-HK61-P3/2020 - D614G : hCoV-19/Hong Kong/2161-P5/2020 - Alpha : hCoV-19/Hong Kong/3268-P2/2020 - Beta : hCoV-19/Hong Kong/4527-P2/2021 - Delta : hCoV-19/Hong Kong/VOC0013P2D5/2021 - Omicron : hCoV-19/Hong Kong/VOC0195-P2/2021	Infection pendant 1h à 5x10 ⁵ TCID ₅₀ /ml suivie de 3 lavages. Maintien en culture avec du milieu frais	Infection de l'épithélium cilié, des cellules clubs et des cellules goblets		3	35104836
Cellules épithéliales alvéolaires	SARS-CoV-2 BetaCoV/Hong Kong/VM20001061/2020	Infection à MOI 2	Pas de réplication virale détectée	Induction d'une faible réponse inflammatoire via la production de TNF-α, CXCL10, RANTES, IL-6 et MCP-1	4	32386571

Cellules endothéliales en culture classique ou vaisseaux 3D	SARS-CoV-2 isolat hCoV-19/Australia/QLD02/2020	Infection à 6×10^4 PFU (estimation MOI 1) ou 2×10^6 PFU (estimation MOI 30) pendant 1h puis maintien en culture avec du milieu frais sans lavage	Aucune infection virale des cellules endothéliales à MOI 1. Infection abortive des cellules endothéliales à MOI 30	Induction d'une réponse inflammatoire via augmentation de l'expression d'ICAM-1, d'IL-6 et de CXCL10	5	34721846
Tissus bronchiques - Culture ALI	SARS-CoV-2 isolate BetaCoV/Hong Kong/VM20001061/2020	Infection pendant 1h à 5×10^5 TCID ₅₀ suivie de 3 lavages. Maintien en culture ALI avec du milieu frais	Infection des cellules ciliées, des cellules goblets et des cellules clubs		6	32386571
BAL	SARS-CoV-2 virus USA-WA1/2020 et SARS-CoV-2 B.1.617.2	Infection à MOI 0.1 ou MOI 1	Infection des AMs. Infection productive du BAL par les deux variants		7	35592107
AMs de BAL	SARS-CoV-2 291.3 FR-4286	Infection pendant 2h ou 8h à MOI 1	Pas de reconnaissance virale par les AMs.	Aucune induction de production d'IFN ou d'ISGs	8	33112036
AMs de BAL	SARS-CoV-2 virus USA-WA1/2020 et SARS-CoV-2 B.1.617.2	Infection à MOI 0.1 ou 1	Infection productive dans les AMs et propagation virale sans induction de mort cellulaire	Induction d'ISGs	9	35592107
AMs de BAL	SARS-CoV-2 isolate hCoV-19/Australia/VIC01/2020	Infection pendant 1h à MOI 1 suivi d'un lavage puis maintien en culture avec du milieu frais	Infection abortive des AMs		10	37098119

MPs dérivés des Mos	SARS-CoV2 USA-WI1/2020	Infection pendant 4h à MOI 0.01 suivie de 3 lavages.	Infection restrictive des MPs avec observation d'une persistance virale	Induction de gènes cytokines et chimiokines inflammatoires et réponse IFN atténuée	11	34671355
MPs dérivés des Mos	SARS-CoV-2 BetaCoV/Hong Kong/VM20001061/2020	Infection à MOI 0.1 pour étudier la cinétique d'infection et à MOI 2 pour l'analyse des réponses cytokiniques	Aucune observation d'une réplication virale dans les MPs	Induction d'une faible réponse inflammatoire via la production de TNF- α , CXCL10, RANTES, IL-6 et MCP1	12	32386571
MPs dérivés des Mos	SARS-CoV-2 isolate hCoV-19/Australia/QLD02/2020	Infection pendant 1h ou 24h à 2.5×10^6 PFU (MOI 5) ou à 2.5×10^5 PFU (MOI 0.5)	Infection abortive des MPs.	Aucune induction de réponse inflammatoire	13	37098119
MPs dérivés des Mos	SARS-CoV-2 WT : Chinese-derived strain D614, lineage A - PV10734 : D614G, lineage B.1.1 - Alpha : lineage B.1.1.7	Infection pendant 2h à MOI 0.05 suivie de lavage et maintien en culture avec du milieu frais	Infection abortive des MPs mais pourraient participer à la dissémination virale		14	34834984
MPs dérivés des Mos	SARS-CoV-2 2019n-CoV/USA-WA1/2019	Infection pendant 1h à MOI 2 suivie ou non de lavage	Infection abortive des MPs	Induction d'expression d'IFN- α , de TNF- α , d'IL-6, IL-8, IL-10, CXCL10 et IL-1 β	15	33277988
AMs d'explants	SARS-CoV-2 FI-200	Perfusions répétées d'explants pulmonaires afin d'isoler les AMs puis infection à 30×10^6 PFU/ml	Infection productive dans les AMs	Induction d'ISGs	16	35728978
Organoïde	SARS-CoV-2 hCoV-19/China/CAS-B001/2020	Infection à MOI 0.2	Infection des cellules ciliées, cellules basales, cel-	Induction d'une réponse inflammatoire via la production de CCL5,	17	34750367

			lules clubs, cellules goblets, pneumocytes de type I et pneumocytes de type II	CCL20 et CCL28 ainsi que par l'activation de la voie MAPK et p53. Altération de nombreuses voies métaboliques.		
Organoïde	SARS-CoV-2-2020_WA1	Infection pendant 24h à MOI 0.5 puis maintien en culture avec du milieu frais	Infection permissive des organoïdes bronchique et alvéolaire		18	35360113
Organoïde nasal humain – Culture ALI	SARS-CoV-2 USA-WA1/2020	Infection pendant 1h30 à MOI 0.01	Infection des cellules épithéliales. Infection productive de l'organoïde	Induction faible de cytokines et chimiokines inflammatoires via la production de CXCL10, CXCL9, CXCL11, RANTES, d'IL-8 et de VEGF- α mais aucune induction d'IFN-II	19	35164569
Organoïde – culture ALI	SARS-CoV-2 isolate BetaCoV/Munich/BavPat1/2020	Infection pendant 2h à MOI 0.01 ou MOI 0.1 suivie de 3 lavages. Maintien en culture avec du milieu frais	Infection des cellules alvéolaires et des cellules ciliées, rare infection des cellules clubs	Induction de réponses ISGs suite à la production d'IFN-I et -III. Induction de cytokines et chimiokines inflammatoires.	20	33283287
Poumon-sur-lame – culture ALI	SARS-CoV2/Switzerland/GE9586/2020	Infection pendant 1h à environ 400-600 PFU. Maintien en culture ALI	Infection des cellules épithéliales et endothéliales	Induction d'une production d'IFN-I par les cellules endothéliales et les MPs	21	35045565

Explants pulmonaires	SARS-CoV-2 FI-200	Infection à 1×10^6 ou 30×10^6 PFU/ml sans lavage	Réplication virale faible même à haute dose. Infection des AMs majoritaire et plus faiblement des pneumocytes de type II	A faible dose virale, expression génique faible de TNF- α et aucune signature antivirale ou IFN. A haute dose virale, induction forte de gènes antiviraux et inflammatoires	22	35728978
Explants pulmonaires	SARS-CoV-2 WT : hCoV-19/Hong Kong/WHV-HK61-P3/2020 - D614G : hCoV-19/Hong Kong/2161-P5/2020 - Alpha : hCoV-19/Hong Kong/3268-P2/2020 - Beta : hCoV-19/Hong Kong/4527-P2/2021 - Delta : hCoV-19/Hong Kong/VOC0013P2D5/2021 - Omicron : hCoV-19/Hong Kong/VOC0195-P2/2021	Infection pendant 1h à 5×10^5 TCID ₅₀ /ml suivie de 3 lavages. Maintien en culture avec du milieu frais	Infection des pneumocytes de type I		23	35104836
Explants pulmonaires	SARS-CoV-2 BetaCoV/Hong Kong/VM20001061/2020	Infection pendant 1h à 5×10^5 TCID ₅₀ suivie de 3 lavages. Maintien en culture ALI avec du milieu frais	Infection des pneumocytes de type I. Aucune évidence d'infection de l'endothélium vasculaire et des MPs		24	32386571
Explants pulmonaires		Infection à 10^4 PFU par explant pendant 12h suivie de 3 lavages ou infection pendant 24h	Infection productive des explants	Induction d'une réponse transcriptomique d' <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> et plus légèrement d' <i>IFNB1</i>	25	34357881

Explants pulmonaires	SARS-CoV-2 HKU-001a	Infection pendant 2h à 1×10^6 PFU/ml suivie de 3 lavages. Maintien en culture avec du milieu frais	Infection des pneumocytes de type I, des pneumocytes de type II et des AMs. Infection virale productive des explants	Pas d'induction significative d'IFN et induction faible de cytokines et chimiokines inflammatoires : IL-6, MCP-1, CXCL1, CXCL5, CXCL10	26	32270184
PCLS	SARS-CoV-2 USA-WA1/2020	Infection pendant 2h à MOI 1 suivie d'un lavage. Maintien en culture avec du milieu frais	Infection des pneumocytes de type II, des myofibroblastes, des IMs, des AMs et de quelques lymphocytes T CD4 ⁺ . Infection productive des PCLS	Observation d'un takeover viral des IMs. Induction de cytokines et chimiokines inflammatoires dans les macrophages interstitiels via la production d'IL-6, IL-10, de CCL2, CCL7, CCL8, CCL13 et CXCL10. Induction d'une réponse plus limitée dans les AMs.	27	https://doi.org/10.1101/2022.05.10.491266
PCLS	SARS-CoV-2 USA-WA1/2020	Infection pendant 1h à 2×10^5 TCID ₅₀ par coupe suivie d'un lavage. Maintien en culture avec du milieu frais	Infection des pneumocytes de type II. Infection productive des PCLS	Induction de cytokines et chimiokines inflammatoires telles qu'IL-8, CXCL10, MCP-1, IL-1 β , TNF- α , RANTES et MIG avec des variabilités entre individus.	28	37131640
PCLS	SARS-CoV-2 USA-WA1/2020	Infection à 2×10^5 TCID ₅₀ /puit pendant 12h suivie de 3 lavages. Maintien en culture avec du milieu frais	Infection des cellules épithéliales alvéolaires. Infection productive des PCLS	Faible voir absence de réponse IFN-I, -II et -III et induction restrictive d'une réponse immunitaire innée	29	33893170

PCLS	SARS-CoV-2 virus USA-WA1/2020 et SARS-CoV-2 B.1.617.2	Infection à MOI 0.1 ou MOI 1	Infection des cellules épithéliales, des IMs, des Mos et des DCs dérivées des Mos.		30	35592107
------	---	------------------------------	--	--	----	----------

Tableau 1. Récapitulatif des modèles *in vitro* utilisés dans la littérature pour l'étude de l'infection par le SARS-CoV-2.

1.7 LES VOIES DE DETECTION VIRALE LORS DE L'INFECTION PAR LE SARS-CoV-2

Lors d'une l'infection virale, le déclenchement de la réponse immunitaire repose sur la reconnaissance des signatures moléculaires portées par les agents pathogènes, via les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) ou de signaux de danger émis par des cellules endommagées, via les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP). Ces signaux sont reconnus par les cellules immunitaires tissulaires exprimant les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) permettant la mise en place de la réponse immunitaire. Il existe différentes familles de PRR qui sont définies en fonction de leur localisation cellulaire. En effet, ils peuvent se trouver à la membrane plasmique, à la membrane des endosomes ou encore dans le cytosol. L'infection par le SARS-CoV-2 active différents PRRs dont : les TLRs, les récepteurs de type RIG-I (RLRs), les récepteurs de type NOD (NLRs) ainsi que la voie cGAS-STING¹⁵⁹.

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires, qui une fois activés, font intervenir deux voies de signalisation : i) une voie dépendante de MyD88 et ii) une voie dépendante de TRIF. La voie dépendante de Myd88, engagée par l'activation des TLR1,2,4 et 6 va conduire à l'activation des protéines de signalisation MAPK et des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP1, conduisant à la production de cytokines inflammatoires. Cette même voie Myd88, lorsqu'engagée par l'activation des TLR7,8 ou 9 va conduire à l'activation du facteur de régulation des interférons (IRF)-7, en plus des autres facteurs cités ci-dessus, ce qui va activer la production d'IFN-I et -III en plus des cytokines inflammatoires. La voie dépendante de TRIF, engagée par l'activation de TLR3 et 4 va conduire à l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et IRF3, qui commandent également la production de cytokines inflammatoires et d'IFN-I et -III. Les IFN-I et -III vont activer l'expression d'ISGs et de nombreuses molécules interférant sur le cycle viral^{159,160}. Lors de l'infection par le SARS-CoV-2, les protéines structurales S et E activent le TLR2, qui par la voie Myd88, déclenchent la mise en place de la

réponse inflammatoire^{159,161}. L'ARN viral est reconnu par le TLR7 qui est exprimé de manière constitutive dans les pDCs, leur permettant de sécréter et relarguer de hauts taux d'IFN- α lors de l'infection¹⁶². Enfin, le TLR3 est également activé suite à l'infection, dont la réponse passant par le facteur de transcription IRF3 induit la production d'IFN-I et de facteurs anti-viraux¹⁶³. Les TLR7 et TLR3 semblent majeurs dans la réponse anti-SARS-CoV-2 puisque des variants génétiques de ces molécules ont été associés à la gravité de l'infection^{160,164}. Enfin, des analyses *in silico* ont également montré une possible implication des TLR1, 4 et 6 via la reconnaissance de la protéine S¹⁶⁵.

Les senseurs intracellulaires RLRs regroupent MDA5, RIG-I et LGP2. Ces senseurs détectent l'ARN simple brin génomique, subgénomique ainsi qu'intermédiaire permettant la mise en place d'une réponse anti-inflammatoire par la production d'IFN et de cytokines inflammatoires. En effet, une fois activés, MDA5 et RIG-I sont transloqués au niveau mitochondrial où ils interagissent avec l'adaptateur MAVS. Cette interaction induit la formation d'un complexe permettant l'activation de TRAF3, TBK1 et IKK puis la phosphorylation d'IRF3. Dans le cas du SARS-CoV-2, ces senseurs permettent la mise en place de la réponse immunitaire au niveau des cellules épithéliales pulmonaires où les intermédiaires viraux produits lors de la réplication permettent leur activation^{83,166,167}. Cependant, le rôle de RIG-I dans la mise en place de la réponse IFN reste mal défini puisque certaines études montrent que sa présence est nécessaire¹⁶⁶ alors que d'autres montrent l'inverse^{83,168}.

Les NLRs, et plus précisément NLRP3, sont importants dans la réponse anti-virale. NLRP3 active la voie de l'inflammasome permettant la production et le relargage de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et IL-18 ainsi que le clivage de la gasdermine D induisant la mort cellulaire par pyroptose¹⁵⁹. La protéine N ainsi que la S

interagissent de manière directe avec la protéine NLRP3 permettant l'activation de la voie de l'inflammasome^{169,170}. Cette voie d'activation semble être importante dans les Mos et les MPs^{170,171}. Au niveau des MPs, cette activation lors de la primo-infection induit une reprogrammation épigénétique conférant une mémoire de l'immunité innée. Cette reprogrammation pourrait être impliquée dans l'expression des syndromes post-COVID19¹⁷⁰.

Enfin, d'autres senseurs cytosoliques sont également importants comme la voie cGAS-STING. Cette voie est activée lors de la détection d'ADN cytoplasmique pouvant provenir de la mitochondrie. L'infection par le SARS-CoV-2 induit des dommages mitochondriaux¹⁷², favorisant le relargage d'ADN mitochondrial au niveau cytoplasmique^{173,174}. Ce relargage induit l'activation de la voie cGAS-STING permettant la mise en place de la réponse immunitaire innée par la production de cytokines pro-inflammatoires et d'IFN-I. Cependant, le virus a développé divers mécanismes qui bloquent cette voie de sensing notamment avec l'ORF3a qui se lie à STING bloquant l'accumulation nucléaire de p65 ou encore 3CL qui bloque l'ubiquitination de STING¹⁷⁵.

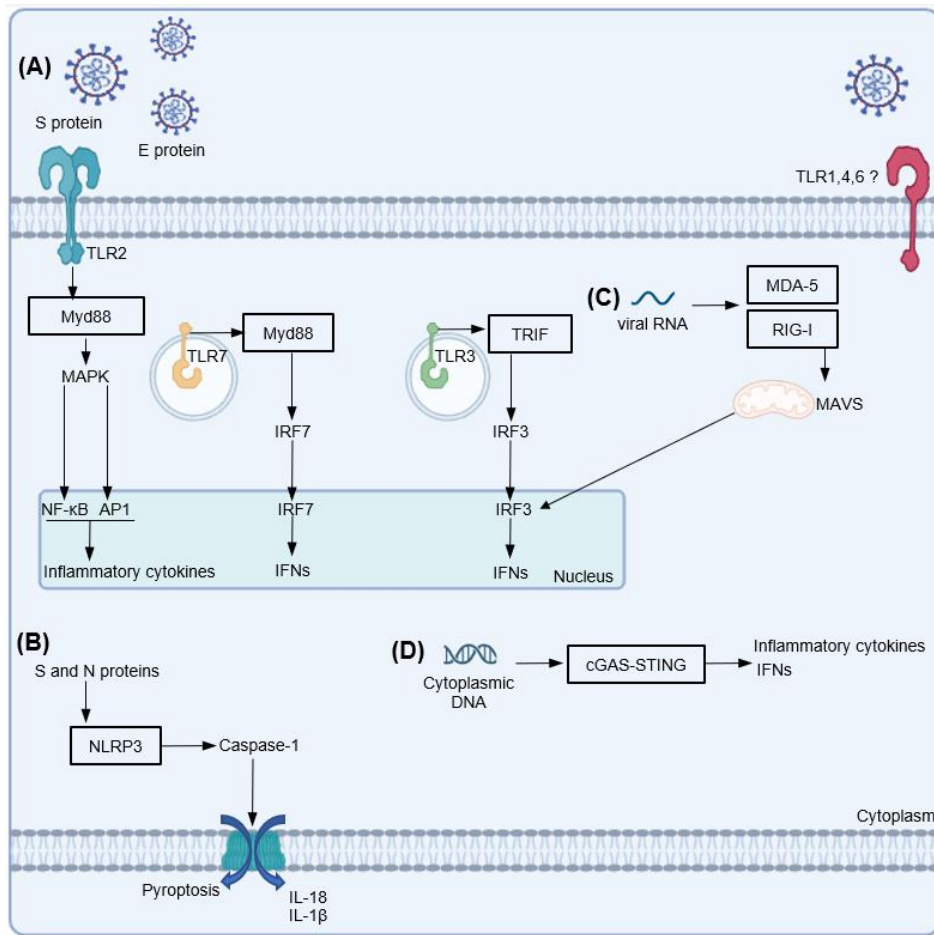


Figure 5. Voies de détection virale (sensing) lors de l'infection par le SARS-CoV-2 (adapté de *Diamond et Kanneganti, 2022*¹⁵⁹) : Lors de l'infection virale, différentes voies permettent le sensing viral : (A) la voie des TLRs est activée par différents facteurs viraux et induit la transcription/traduction de cytokines inflammatoires ainsi que d'IFNs. (B) la voie NLRP3 est activée par la liaison directe des protéines virales N et S activant la voie de l'inflammasome permettant la production et le relargage de cytokines-pro-inflammatoires ainsi que la mort cellulaire par pyroptose suite au clivage de la gasdermine D. (C) l'ARN viral est détecté par les RLRs (MDA-5, RIG-I) qui vont interagir au niveau mitochondrial avec MAVS permettant la phosphorylation d'IRF3 et l'induction de réponses IFNs. (D) l'ADN cytoplasmique relargué suite aux dommages mitochondriaux induits par l'infection virale est détecté par la voie cGAS-STING activant la réponse immunitaire innée. Figure réalisée avec Biorender.

1.8 LA PERFUSION PULMONAIRE *EX-VIVO* (PPEV)

La transplantation pulmonaire est le traitement de dernier recours pour les patients atteints d'une insuffisance respiratoire terminale. Cependant, le poumon est un organe fragile et seulement 20% des donneurs présentent des poumons jugés acceptables pour la greffe^{176,177(review)}. Les greffons sont évalués selon l'historique clinique et tabagique du donneur, des antécédents médicaux et selon la cause et mode du décès. La raison courante de refus repose sur la qualité des poumons jugée insuffisante et en conséquence, des patients meurent sur liste d'attente. Ainsi, l'augmentation du nombre de greffons utilisables est nécessaire et elle passe par l'utilisation de poumons dits « marginaux » c'est-à-dire provenant de donneurs sélectionnés selon des critères élargis¹⁷⁸. Cet élargissement des critères de sélection est permis par l'utilisation de la PPEV. Elle a été mise au point en Suède par le professeur Stig Steen en 2001 et implique une perfusion extracorporelle tout en appliquant une ventilation artificielle¹⁷⁹. Diverses études ont cherché à évaluer si la PPEV pouvait aussi être utilisée afin de réparer des poumons plus fortement lésés, nous en discuterons plus en détails ci-dessous.

1.8.1 PPEV et reconditionnement pulmonaire

Le principe de cette technique est basé sur la perfusion des poumons à 37°C (normothermie) en contrôlant le débit et la pression exercés. De plus, les poumons sont ventilés de façon protectrice en pression positive. Les composants basiques de ce système sont : une solution optimisée pour perfuser les poumons, un ventilateur, un réchauffeur, une pompe centrifuge contrôlant la circulation, un réservoir pour contrôler le volume du circuit, un filtre à dé-leucocyter afin d'éliminer les cellules immunitaires et une membrane qui assure les échanges gazeux¹⁸⁰. Il existe 3 protocoles de PPEV différents qui sont actuellement utilisés en clinique : le protocole Lund, le protocole de Toronto et le protocole « Organe Care System » (OCS). Les principales différences entre eux résident dans la solution de perfusion, composée ou non de globules rouges

(cellulaire ou acellulaire), mais également dans les débits de perfusion et de ventilation¹⁸⁰. Cependant, les résultats du reconditionnement restent similaires d'un protocole à l'autre^{181(review)}. La durée de la PPEV est, en général, de 4h au bout de laquelle les poumons sont évalués fonctionnellement afin de déterminer s'ils peuvent être transplantés.

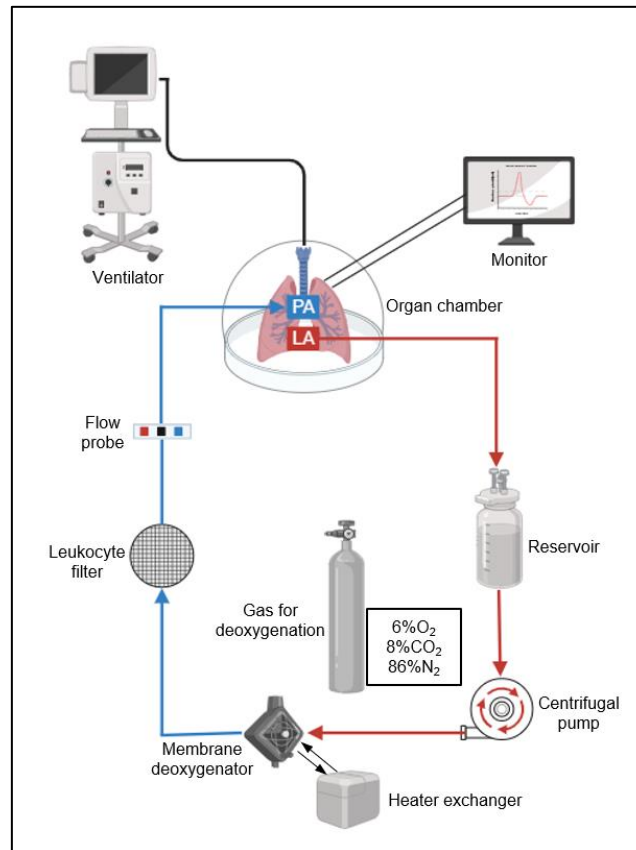


Figure 6. Circuit de perfusion pulmonaire ex vivo – protocole de Toronto (adapté du M2 de A. Premachandra) : un ventilateur connecté à la trachée permet d'appliquer une ventilation en pression positive, de manière à réoxygéner l'organe et lever les collapsus alvéolaires (atélectasies). Le circuit de circulation extracorporelle à 37°C permet de perfuser l'organe au niveau de l'artère pulmonaire (PA). Le perfusât s'écoule de l'oreillette gauche (LA) vers un réservoir, puis est pris en charge par une pompe centrifuge de manière à générer un débit préréglé. Le circuit comprend une membrane permettant d'oxygéner ou de désoxygéner le perfusât, un échangeur de chaleur permettant de le réchauffer, et un filtre à déleucocyter. Figure réalisée avec Biorender.

1.8.2 Impact clinique de la PPEV

Le développement de cette technique a permis d'augmenter, parfois jusqu'à 20%, le nombre de greffons disponibles en permettant la transplantation de poumons marginaux avec une même survie à long terme des receveurs^{182,183}. De plus, elle semble diminuer le risque de développer une dysfonction primaire du greffon (DPG) de niveau 3 (grave) intervenant dans les 72h suivant la greffe selon certaines études, mais ces résultats ne sont pas toujours confirmés^{184,185}. L'ensemble des études montre qu'il n'y a globalement pas de différence de résultats cliniques entre l'utilisation de poumons marginaux avec PPEV comparé à l'utilisation de poumons transplantés selon les critères conventionnels^{186,187}. Par exemple, Sage *et al* rapportent qu'aucune différence n'a été observée que ce soit sur la survenue de la DPG mais également sur le temps médian d'extubation, le temps d'hospitalisation, la mortalité à 30 jours ou le taux de survie à 1 an post-greffe¹⁸⁸.

1.8.3 Les effets biologiques de la PPEV

Durant la PPEV, l'application d'une ventilation artificielle en pression positive permet de lever et de prévenir les atelectasies mais également de récupérer la capacité respiratoire des poumons^{188,189}. Cependant, malgré les améliorations de cette technique, il existe encore des effets biologiques probablement délétères pour l'organe. En effet, l'application prolongée de la PPEV induit l'apparition d'un œdème pulmonaire conduisant à une baisse de la fonctionnalité de l'organe ainsi qu'à des risques lésionnels^{190,191}. Des recherches ont également mis en évidence la mise en place d'une inflammation, considérée comme légère, par la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-8¹⁹². Enfin, des analyses génomiques en « bulk » réalisées sur des poumons marginaux ont mis en lumière une association entre la PPEV et l'expression temporaire de profils géniques relatifs à l'inflammation. Cette étude montre toutefois que les profils géniques inflammatoires sont rapidement inhibés

durant la PPEV et les auteurs associent cette réponse temporaire à une réponse réparatrice des poumons lésés¹⁹³.

1.8.4 PPEV et traitements thérapeutiques

Au-delà du reconditionnement décrit précédemment sur des poumons marginaux, la PPEV pourrait également permettre de prodiguer des traitements à des poumons franchement dégradés et de les réparer. De nombreuses études pré-cliniques s'intéressent à ce potentiel réparateur en utilisant des modèles animaux dont les plus populaires sont le porc et le rat. Le modèle porcin est très avantageux car il partage de nombreuses caractéristiques anatomiques, physiologiques et immunitaires avec l'Homme. De plus, les conditions d'utilisation de la PPEV sont les mêmes qu'en clinique humaine^{194(review)}. C'est d'ailleurs ce modèle qui a été utilisé par l'équipe de Toronto afin de réaliser les mises au point de la PPEV avant de faire la transposition à l'Homme. Le modèle rat présente des différences de taille et de physiologie avec l'Homme ce qui modifie fortement les conditions de perfusion et de ventilation. Les effets biologiques observables avec ce modèle sont donc difficilement transposables à l'Homme^{194(review)}.

1.8.4.1 Les lésions ischémiques

Avant d'être placé sous PPEV, l'organe peut avoir été préservé à froid (méthode classique des donneurs en mort encéphalique) ou à chaud (donneurs en mort circulatoire). Le poumon ainsi préservé souffre d'une insuffisance en apport d'oxygène ce qui génère des perturbations au niveau du métabolisme gluco-énergétique. Lorsque l'organe est perfusé sur la machine, l'apport brusque en oxygène induit une réponse mitochondriale exacerbée avec une reprise anarchique du cycle de Krebs ainsi qu'une production de radicaux libres insuffisamment contrôlée par les mécanismes anti-oxydants. Ces réponses à l'apport brutal en oxygène conduisent à une réponse inflammatoire importante et délétère^{195(review)}. Pour pallier ces phénomènes, différentes options de traitement ont été testées pendant la PPEV post-ischémie longue avec

succès comme : les agonistes du récepteur à l'adénosine A2A¹⁹⁶, les inhibiteurs de peroxy-nitrite ainsi que de poly(ADP-ribose) polymérase¹⁹⁷, les α 1-anti-trypsine (A1AT)¹⁹⁸, les inhibiteurs HSP90¹⁹⁹ ou encore l'utilisation de l'IL-10²⁰⁰ ou de cellules progénitrices²⁰¹.

1.8.4.2 L'Organe infecté

La présence de pathogènes bactériens ou viraux chez les donneurs peut limiter l'accès à certains greffons dû aux trop grands risques de complications pouvant survenir chez le receveur post-transplantation. Ainsi, l'application de traitements thérapeutiques lors de la PPEV en vue de traiter ces infections présentes au niveau du greffon, permettrait d'augmenter le pool de greffons disponibles sans altérer la survie des receveurs post-transplantation²⁰². C'est le cas du cytomégalovirus humain (HCMV) latent qui est très souvent transmis lors de la greffe pulmonaire et dont la réactivation post-transplantation impacte négativement le devenir des receveurs. L'utilisation de l'immunotoxine F49A-FTP lors de la PPEV permet de détruire le HCMV latent présent dans le greffon et donc de diminuer les risques de réactivation virale une fois l'organe transplanté²⁰³.

Au total, la PPEV apparaît comme une technique d'évaluation et de récupération fonctionnelle avec le maintien en vie d'un organe, qui semble plutôt conservatif étant donné les résultats cliniques très satisfaisants, sur des greffons à priori en moins bon état que les poumons standards. Elle pourrait également permettre une réparation de l'organe lésé mais ceci reste à démontrer car la régénération cellulaire n'a pas été prouvée durant ce processus. De plus, pendant la PPEV, l'organe présente une activité cellulaire métabolique en dehors de la cage thoracique mais également en dehors des régulations par un organisme complet ce qui pourraient impacter le devenir du greffon. Ainsi, les connaissances sur les réponses biologiques durant la PPEV sont encore limitées et nécessitent d'être étudiées de manière plus approfondie.

2 PROBLEMATIQUE

Problématique principale : La réponse initiale au SARS-COV-2 est mal connue, car il s'agit d'une fenêtre très courte et difficile à étudier chez l'Homme. Or, les interactions initiales entre les cellules et le virus pourraient conditionner la balance entre la réplication virale et les défenses immunitaires protectrices et conduire à l'immunopathologie des formes sévères. Le compartiment des cellules phagocytaires mononucléées subit une perturbation massive lors de l'infection. Cela indique que ces cellules, même si elles ne semblent pas permettre de cycle productif viral, jouent un rôle crucial dans la pathogenèse. Leur implication dans les premières étapes de l'infection du poumon a été peu étudiée. Les modèles animaux *in vivo* pour étudier les réponses initiales présentent des limites liées à la spécificité d'espèces. Chez l'Homme, plusieurs modèles *in vitro* ont été établis afin de mimer l'interaction initiale entre les cellules pulmonaires et le virus, dont la majorité sont des explants pulmonaires. Cependant, les résultats obtenus diffèrent, certaines études montrent une infection touchant uniquement des cellules épithéliales^{204,205}, tandis que d'autres montrent une infection qui touche à la fois des cellules épithéliales et des MPs^{131,206} ou encore que les AMs sont les cellules principalement infectées¹²⁶. Dans l'ensemble, les systèmes d'études *in vitro* ne permettent pas de respecter l'architecture et l'empreinte tissulaire ni les contraintes anatomiques qui dirigent les interactions entre les cellules et le virus. D'autre part, chez l'Homme, la majorité des études concerne les phases tardives de l'infection, mais aucune n'étudie les réponses cellulaires initiales ayant lieu lors des premières heures suivant l'infection dans le poumon. Enfin, de nombreux récepteurs au virus ont été identifiés, indiquant que le virus a de multiples cibles. Toutefois, celles qui sont visées par le virus au temps précoces ne sont pas bien connues.

Par conséquent, le travail principal de ma thèse a consisté à définir **quelles sont les**

premières étapes de l'infection par le SARS-CoV-2 au niveau pulmonaire en étudiant les cellules cibles aux temps précoces de l'infection ainsi que leurs réponses, en faisant un focus sur le compartiment des MPs et des Mos. Nous avons proposé d'évaluer un modèle novateur : l'infection de poumons humains entiers refusés pour la transplantation et mis sous PPEV, avec l'emploi du scRNA-seq. Le modèle poumon entier n'a pas été utilisé auparavant en infectiologie, à l'exception de l'infection par la bactérie *Klebsiella* chez le porc²⁰⁷. Nous avons complété cette étude sur poumon entier avec des cellules triées obtenues à partir d'exérèses pulmonaires, grâce aux chirurgiens thoraciques présents dans notre équipe, ce qui est aussi une approche originale.

Ainsi le travail de thèse a visé à répondre aux questions principales suivantes :

- Quelles sont les cibles cellulaires du SARS-CoV-2 dans le contexte du poumon entier et leur réponse initiale ?
- En quoi le poumon maintenu en EVLP permet-il d'étudier les interactions initiales entre l'hôte et le SARS-CoV-2 ?

Ces questions sont traitées en partie 3.2.

Problématique secondaire : Au cours de l'évaluation du modèle d'infection de poumon entier, nous avons utilisé des poumons non-infectés qui nous ont servi de contrôles. Nous avons pu observer que la PPEV seule induit des réponses cellulaires importantes dont des réponses inflammatoires. Cette observation nous a donc amenés à nous pencher sur **l'analyse des réponses biologiques induites par la technique de la PPEV**, qui sont mal connues, notamment à l'échelle du type cellulaire. Cette analyse permet d'apporter des informations intéressantes à la fois pour la clinique de la transplantation, mais également dans notre projet, afin de pouvoir définir les réponses qui sont attribuables à l'infection par le SARS-CoV-2 de celles qui sont attribuables à la PPEV. Ces résultats nous ont montré que si la PPEV permet un maintien en vie du

poumon, elle est très probablement perfectible pour se rapprocher davantage d'une physiologie homéostatique. Nous avons proposé de **corriger, durant la PPEV, le défaut d'épuration des déchets métaboliques** de l'organe maintenu en absence de foie et de rein, en ajoutant un processus de dialyse au circuit *ex vivo*, et ceci dans le modèle porc.

Ainsi le travail de thèse s'est développé sur des questions additionnelles et liées à la problématique principale :

- Quelle est la réponse biologique du poumon à l'EVLP au niveau des différents types cellulaires ? Cette question est traitée en partie 3.1.
- Peut-on améliorer l'homéostasie du poumon dans les conditions PPEV par la dialyse ? Cette question est traitée en partie 3.3.

3 RESULTATS :

3.1 MANUSCRIT N°1



OPEN ACCESS

EDITED BY
Alain Haziot,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM), France

REVIEWED BY
Anthal Smits,
Eindhoven University of Technology,
Netherlands
David Peter Al-Adra,
University of Wisconsin-Madison,
United States
Kerstin B. Meyer,
Wellcome Sanger Institute (WT),
United Kingdom
Pascal Barbry,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

*CORRESPONDENCE
Isabelle Schwartz-Cornil
Isabelle.schwartz@inrae.fr
Thien-Phong Vu Manh
vumanh@ciml.univ-mrs.fr

†These authors have contributed equally to
this work

Cell type- and time-dependent biological responses in *ex vivo* perfused lung grafts

Carla Gouin^{1†}, Thien-Phong Vu Manh^{2*†}, Luc Jouneau^{1,3},
Claudia Bevilacqua⁴, Julien De Wolf^{1,5}, Matthieu Glorion^{1,5},
Laurent Hannouche^{1,2}, Céline Urien¹, Jérôme Estephan¹,
Antoine Roux^{1,6}, Antoine Magnan^{1,6}, Morgan Le Guen^{1,7},
Bruno Da Costa¹, Christophe Chevalier¹, Delphine Descamps¹,
Isabelle Schwartz-Cornil^{8*}, Marc Dalod² and Edouard Sage^{1,5}

¹Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France, ²Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, CIML, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Turing Center for Living Systems, Marseille, France, ³Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France, ⁴Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France, ⁵Department of Thoracic Surgery and Lung Transplantation, Foch Hospital, Suresnes, France, ⁶Department of Pulmonology, Foch Hospital, Suresnes, France, ⁷Department of Anesthesiology, Foch Hospital, Suresnes, France

Introduction : La PPEV est une technique utilisée en transplantation pulmonaire lors de laquelle des poumons isolés sont perfusés et ventilés à normothermie pendant plusieurs heures avant la transplantation. Comme exposé dans la partie 1.8 de l'introduction, cette technique permet le reconditionnement de poumons dits marginaux qui récupèrent les critères fonctionnels requis pour la transplantation pulmonaire. En pratique clinique, la PPEV dure entre 4 et 6 heures, au-delà un œdème pulmonaire apparaît de manière quasi-systématique sans qu'on ne connaisse les mécanismes qui y sont associés. De plus, la PPEV est également associée à des réponses inflammatoires et au stress dont l'étendue est corrélée avec l'apparition de la DPG chez le receveur. En effet, on pourrait craindre que cet environnement pro-inflammatoire ne déclenche l'activation des APCs myéloïdes du donneur, comme les DCs, et aussi celles des cellules lymphoïdes, ce qui induirait des réponses immunitaires conduisant à la DPG mais également aux phénomènes de rejet. Afin de pouvoir

améliorer les résultats de la PPEV à terme, nous devons comprendre les réponses biologiques induites par la technique au niveau pulmonaire, ce qui permettrait également de tester des stratégies thérapeutiques afin de réduire l'inflammation. De plus, dans le cadre de ma thèse, il est nécessaire d'analyser l'effet intrinsèque de la PPEV sur les réponses cellulaires du poumon, de manière à avoir une position critique sur l'emploi du poumon maintenu *ex vivo* pour étudier les réponses au SARS-CoV-2.

Méthode : Pour ce faire, nous avons utilisé deux poumons refusés pour la transplantation que nous avons mis sous PPEV pendant 10h. Les échantillons récupérés aux temps 0h, 4h et 10h ont été analysés par scRNA-seq, technique permettant d'évaluer les réponses géniques des différents types cellulaires dans un même tissu.

Résultats : Après avoir procédé à l'identification des différents types cellulaires pulmonaires, nous avons observé et analysé les changements transcriptomiques détectés dans les différents compartiments cellulaires entre les différents temps de perfusion (0h, 4h et 10h). L'analyse de génomique fonctionnelle des modulations d'expression génique a été faite par deux méthodes, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) et Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) contre la base de données Hallmark. Ces méthodes ont donné des résultats généralement concordants et ont montré que les cellules épithéliales présentent une prédiction significative de l'activation des voies géniques liées aux réponses inflammatoires particulièrement à 10h, ainsi qu'une diminution des voies liées au cytosquelette. Au niveau du compartiment endothélial, on a observé une prédiction d'activation des voies liées aux réponses inflammatoires et des voies de l'endothéline et de l'apeline dans les cellules endothéliales sanguines et non pas dans les lymphatiques. Le compartiment des cellules lymphoïdes (cellules T CD4+, T CD8+ et NK) semble très faiblement activé par la PPEV. En effet, les signatures géniques apparaissent principalement liées à une inhibition de l'activation de ces cellules pendant la PPEV avec une prédiction de l'augmentation de l'expression des gènes immunosuppresseurs et une réduction de la signalisation du cytosquelette et

des voies de la mobilité cellulaire. Enfin, le compartiment des cellules myéloïdes s'est montré fortement impacté durant la PPEV avec des réponses différentes selon les sous-types cellulaires. L'expression des gènes liés aux voies de l'inflammation est augmentée séquentiellement de manière transitoire, d'abord à 4h dans les AMs puis de manière forte dans les MoMacs et les cMos à 10h. Les ncMos et les mastocytes ne semblent pas répondre sur le plan transcriptomique pendant la PPEV, et de manière très intéressante, les cellules dendritiques conventionnelles de type 2 (cDC2) présentent des profils d'expression prédictifs d'une inhibition de leur activation et maturation. De plus, on observe également une prédiction de la réduction des voies liées à l'organisation du cytosquelette et de la migration cellulaire, notamment à 10h chez tous les types cellulaires du compartiment myéloïde. Par ailleurs, la contribution relative de chaque sous-population à la réponse inflammatoire montre une sélectivité d'expression des gènes codant pour certaines cytokines et chimiokines entre les différentes sous-populations au cours de la PPEV, surtout à 4h. Lorsqu'on regarde les valeurs absolues d'expression moyenne des gènes codant pour des cytokines et chimiokines, on observe que les gènes *TNFA*, *IL1B*, *CXCL5* et *IL1A* sont principalement exprimés par les monocytes/macrophages, le gène *CXCL1* par les cellules épithéliales et les gènes *CCL2* et *IL6* par les cellules vasculaires et stromales. Les gènes *CXCL20*, *CXCL8*, *CXCL16* et *CXCL2* sont exprimés par la plupart des cellules à l'exception des cellules lymphoïdes. Enfin, nous avons analysé la réponse du tissu au niveau protéique et avons détecté l'accumulation d'IL-1 β , CXCL8, TNF- α , IL-6, VCAM1 et ICAM1 dans le liquide de perfusion tout au long de la procédure, confirmant ainsi la réponse inflammatoire et l'activation du compartiment endothélial.

Conclusion : Les analyses scRNA-seq offrent une approche puissante permettant de mieux caractériser les réponses biologiques prenant place au niveau de l'organe pendant la PPEV au niveau des types cellulaires. On a pu montrer que les voies liées à l'inflammation sont prédites activées au niveau des cellules épithéliales, des cellules endothéliales et des MoMacs ainsi que des AMs de manière transitoire à 4h. Les voies

liées à la signalisation/organisation du cytosquelette sont prédites comme étant inhibées dans la plupart des sous-types cellulaires, principalement à 10h. On observe également une réduction des propriétés migratoires au niveau des cellules lymphoïdes et myéloïdes, ce qui pourrait être un effet bénéfique de la PPEV. En effet, il a été montré qu'un transfert rapide des leucocytes circulants du donneur dans le sang du receveur est associé au rejet aigu cellulaire. Ainsi, la réduction de la migration leucocytaire en provenance du greffon par la PPEV pourrait diminuer ce risque de rejet²⁰⁸. Nos résultats montrent que des approches thérapeutiques devraient viser à diminuer l'inflammation durant la PPEV, en ciblant les compartiments alvéolaires et vasculaires et éviter l'apparition de l'œdème, tout en maintenant l'inhibition des cellules immunitaires qui pourrait être favorable à la transplantation, et ainsi conduire à une situation plus homéostatique. De plus, l'approche scRNA-seq de poumon entier pourrait être très utile pour évaluer l'effet de ces nouveaux traitements. En tout cas, cette étude montre que le maintien de l'organe *ex vivo* induit des perturbations d'expression génique qui pourraient interférer avec l'analyse de l'effet viral dans le modèle que j'ai cherché à évaluer dans mon travail de thèse.

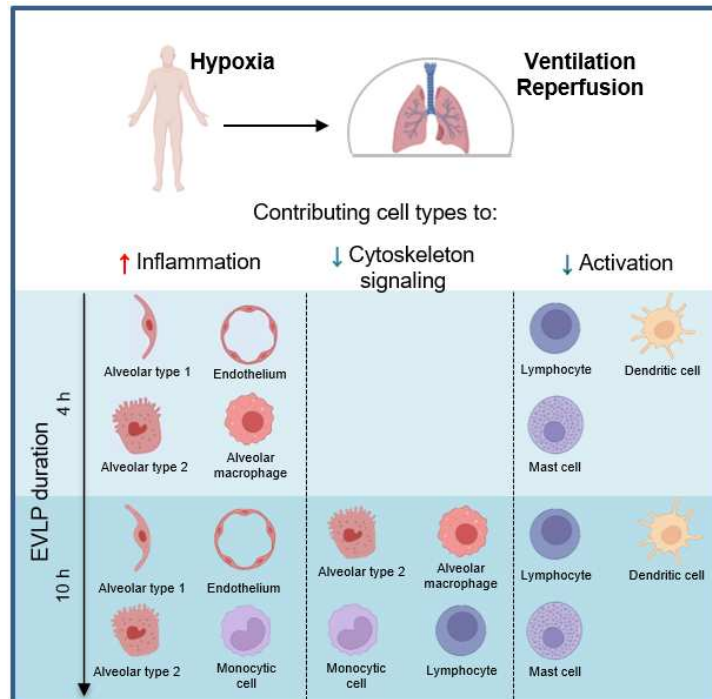


Figure 7. Réponse biologique à la PPEV en fonction des types cellulaires : La PPEV induit une réponse inflammatoire qui varie en fonction du temps et des types cellulaires. Cette réponse s'accompagne d'une réduction de la signalisation du cytosquelette dans la plupart des sous-types cellulaires principalement à 10h ainsi qu'une réduction de la migration et de l'activation des lymphocytes et cellules dendritiques dès 4h de PPEV. Figure réalisée avec Biorender.

Contribution : Au cours de cette étude, j'ai participé à l'isolement des cellules pulmonaires des échantillons de PPEV jusqu'à la préparation de la banque d'ADN complémentaire (ADNc) avant l'envoi au séquençage, avec l'aide de mon encadrante, une technicienne et un ingénieur de plateforme de microgénomique. J'ai ensuite participé aux nombreuses réunions d'analyse des datas scRNAseq avec l'équipe de Marc Dalod et un ingénieur biostatisticien de l'UMR VIM. Nous avons discuté des méthodes d'analyses biostatistiques en fonction de la cohérence avec les résultats biologiques attendus, notamment concernant l'identité des types cellulaires (plus d'un an d'allers-retours entre biostatisticiens et biologistes). J'ai également été formée à l'utilisation du logiciel IPA ce qui m'a permis de participer à l'analyse de nos différentes datas de génomique fonctionnelle avec mon encadrante. J'ai réalisé les expériences de multiplex et d'ELISA. Enfin, j'ai procédé à la présentation des différents résultats sous la forme de figures, que j'ai ensuite structurées pour la soumission de l'article.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Alain Haziot,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM), France

REVIEWED BY

Anthal Smits,
Eindhoven University of Technology,
Netherlands
David Peter Al-Adra,
University of Wisconsin-Madison,
United States
Kerstin B. Meyer,
Wellcome Sanger Institute (WT),
United Kingdom
Pascal Barbry,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

*CORRESPONDENCE

Isabelle Schwartz-Cornil
✉ Isabelle.schwartz@inrae.fr
Thien-Phong Vu Manh
✉ vumanh@ciml.univ-mrs.fr

†These authors have contributed equally to
this work

RECEIVED 11 January 2023

ACCEPTED 13 June 2023

PUBLISHED 03 July 2023

CITATION

Gouin C, Vu Manh T-P, Jouneau L,
Bevilacqua C, De Wolf J, Glorion M,
Hannouche L, Urien C, Estephan J, Roux A,
Magnan A, Le Guen M, Da Costa B,
Chevalier C, Descamps D,
Schwartz-Cornil I, Dalod M and Sage E
(2023) Cell type- and time-dependent
biological responses in *ex vivo* perfused
lung grafts.
Front. Immunol. 14:1142228.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1142228

COPYRIGHT

© 2023 Gouin, Vu Manh, Jouneau,
Bevilacqua, De Wolf, Glorion, Hannouche,
Urien, Estephan, Roux, Magnan, Le Guen,
Da Costa, Chevalier, Descamps,
Schwartz-Cornil, Dalod and Sage. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Cell type- and time-dependent biological responses in *ex vivo* perfused lung grafts

Carla Gouin^{1†}, Thien-Phong Vu Manh^{2*†}, Luc Jouneau^{1,3},
Claudia Bevilacqua⁴, Julien De Wolf^{1,5}, Matthieu Glorion^{1,5},
Laurent Hannouche^{1,2}, Céline Urien¹, Jérôme Estephan¹,
Antoine Roux^{1,6}, Antoine Magnan^{1,6}, Morgan Le Guen^{1,7},
Bruno Da Costa¹, Christophe Chevalier¹, Delphyne Descamps¹,
Isabelle Schwartz-Cornil^{1*}, Marc Dalod² and Edouard Sage^{1,5}

¹Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France, ²Aix-Marseille University, CNRS, INSERM, CIML, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Turing Center for Living Systems, Marseille, France, ³Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, BRED, 78350, Jouy-en-Josas, France, ⁴Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France, ⁵Department of Thoracic Surgery and Lung Transplantation, Foch Hospital, Suresnes, France, ⁶Department of Pulmonology, Foch Hospital, Suresnes, France, ⁷Department of Anesthesiology, Foch Hospital, Suresnes, France

In response to the increasing demand for lung transplantation, *ex vivo* lung perfusion (EVL) has extended the number of suitable donor lungs by rehabilitating marginal organs. However despite an expanding use in clinical practice, the responses of the different lung cell types to EVLP are not known. In order to advance our mechanistic understanding and establish a refined tool for improvement of EVLP, we conducted a pioneer study involving single cell RNA-seq on human lungs declined for transplantation. Functional enrichment analyses were performed upon integration of data sets generated at 4 h (clinical duration) and 10 h (prolonged duration) from two human lungs processed to EVLP. Pathways related to inflammation were predicted activated in epithelial and blood endothelial cells, in monocyte-derived macrophages and temporally at 4 h in alveolar macrophages. Pathways related to cytoskeleton signaling/organization were predicted reduced in most cell types mainly at 10 h. We identified a division of labor between cell types for the selected expression of cytokine and chemokine genes that varied according to time. Immune cells including CD4⁺ and CD8⁺ T cells, NK cells, mast cells and conventional dendritic cells displayed gene expression patterns indicating blunted activation, already at 4 h in several instances and further more at 10 h. Therefore despite inducing inflammatory responses, EVLP appears to dampen the activation of major lung immune cell types, what may be beneficial to the outcome of transplantation. Our results also support that therapeutic approaches aiming at reducing inflammation upon EVLP should target both the alveolar and vascular compartments.

KEYWORDS

transplantation, lung, single cell RNA-seq, monocyte/macrophages, inflammation

Introduction

In order to find a solution to donor lung shortage, a technique called *ex vivo* lung perfusion (EVLP) has emerged in the 2000s, in which isolated lungs are perfused and ventilated at normothermia for several hours prior to lung transplantation (LT) (1). This technique permits the safe preservation of organs between procurement and transplantation and upon EVLP, lungs falling outside organ acceptance standards recover the functional criteria requested for LT, making EVLP an important organ reassessment technique (2). In clinical practice, EVLP is conducted during 4–6 h. When that duration is prolonged, oedema occurs systematically and stands as a major issue of EVLP management (3). Yet prolongation is desired to optimize operating room logistics (4), monitor advanced biomarkers of LT prognosis (5), and apply specific targeted treatments with production of effects such as tissue repair (6), or immunomodulation (7). Hence the mechanisms leading to oedema need to be understood in order to control that issue. EVLP is also associated to inflammatory and stress responses (8, 9) whose extent correlates with primary graft dysfunction (PGD) after lung transplantation in patients (5). This inflammatory milieu that includes inflammatory cytokines (9), reactive oxygen species (8), and damage-associated molecular pattern molecules (10) might trigger the priming of lung donor myeloid antigen-presenting cells such as dendritic cells and lymphoid cells for the induction of adverse immune responses leading to PGD and rejection events.

In order to develop treatments for further improving the results of EVLP, we need to fill the gap of knowledge regarding the biological response induced by EVLP. Indeed the cell-signaling related to the extracorporeal perfusion with synthetic liquid ± erythrocytes and the non-physiological positive pressure of ventilation may differentially affect epithelial, vascular, and immune cell compartments. Several reports have provided transcriptomic information on the global organ response (11–13), but so far not at the cell type level. The single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) technique allows to simultaneously evaluate the gene response of multiple cell types in a tissue. Therefore its implementation for EVLP would both advance our knowledge on the biological effects of EVLP and provide an investigating platform to test therapeutic strategies aiming at reducing inflammation and potentially reconditioning initially damaged organs. In this study, we generated scRNA-seq datasets using two human lungs undergoing prolonged EVLP up to 10 h. Despite the scarcity of donor lungs, these lungs, although well-functional, were declined for transplantation due to lack of recipient of compatible ABO blood group or due to age, therefore such biological material is rare for its availability to research. We robustly identified the different lung cell types and revealed the enriched functional pathways

Abbreviations: LT, Lung transplantation; AMs, alveolar macrophages; MoMacs monocyte-derived macrophages; cMos, classical monocytes; ncMos, non-classical monocytes; cDC2, conventional type 2 dendritic cells; pDCs, plasmacytoid dendritic cells; EVLP, *ex vivo* lung perfusion; PGD, primary graft dysfunction; scRNA-seq, single cell RNA sequencing; C, cluster; IPA, Ingenuity Pathway Analysis; GSEA, DEGs; Gene Set Enrichment Analysis; differentially expressed genes.

common to the two different donors. Inflammatory pathways were predicted to be upregulated in blood endothelial and epithelial cells, monocyte-derived macrophages (MoMacs) and only transiently in alveolar macrophages (AMs), whereas pathways related to cell activation were absent or reduced upon EVLP in several immune cell types, i.e. T cells, NK cells, mast cells and conventional type 2 dendritic cells (cDC2s). Pathways related to cytoskeleton signaling/organization showed reduction in most cell types, especially at 10 h. Together with providing new insight in the biological response to *ex vivo* perfusion, this study also shows that scRNA-seq applied to EVLP will be a highly useful tool for assessing the effects of therapeutic regimens that may further improve the reconditioning of lungs through targeting the alveolar and vascular compartments.

Results

Identification of lung cell types from scRNA-seq data that display important transcriptomic changes upon EVLP at 4 h and 10 h

In order to implement a scRNA-seq workflow for analyzing human lungs undergoing acellular EVLP, we collected lung tissue samples from two donor lungs declined for transplantation. Donor 1's lung was declined due to absence of suitable recipient of the ABO blood group, and donor 2's lung was declined due to age. These lungs did not show initial macroscopic inflammatory lesions nor any signs of injury, their respiratory functions were both very good during the whole duration of EVLP (> 400 mmHg) and of a “transplantable” quality on that basis, as shown in [Additional file 1](#). The samples were collected at 0 h (just before EVLP initiation, i.e. “untreated”), and after 4 h and 10 h EVLP from the two donors, with care to take similar upper lung zones. The scRNA-seq (6 in total) were conducted on 2×10^4 loaded cells from each sample using 10X Genomics 3'end RNA-seq V3 chemistry. The work flow of the analysis of the scRNA-seq data sets is presented in [Additional file 2](#) and extensively detailed in the Methods. High-quality transcriptomes from 43,569 cells were generated upon removal of mitochondrial genes and cell doublets ([Additional files 3, 4](#)). The clustering of the scRNA-seq data of each donor in “time-combined UMAPs” showed that EVLP induced major transcriptomic changes ([Additional file 5](#)). In order to identify clusters corresponding to the same cell types across donors and timings, we integrated our six samples using a batch correction algorithm, generating an initial “integrated UMAP” with 17 clusters that are populated by cells from both donors at all timings ([Additional file 6](#)). In order to determine the cell identity, we applied Azimuth to map our scRNA-seq data onto the Human Lung Cell Atlas (Human lung reference v2). Upon filtration of the data based on Azimuth scores and exclusion of minor identities (see [Additional files 2, 6](#)), we generated an “integrated UMAP-filtered” ([Figure 1A](#)) encompassing 23 cell identities based on cluster (Cx) belonging and Azimuth annotation, i.e. C0-alveolar macrophages (AMs), C1-monocyte-derived macrophage (MoMacs), C2-alveolar type 2

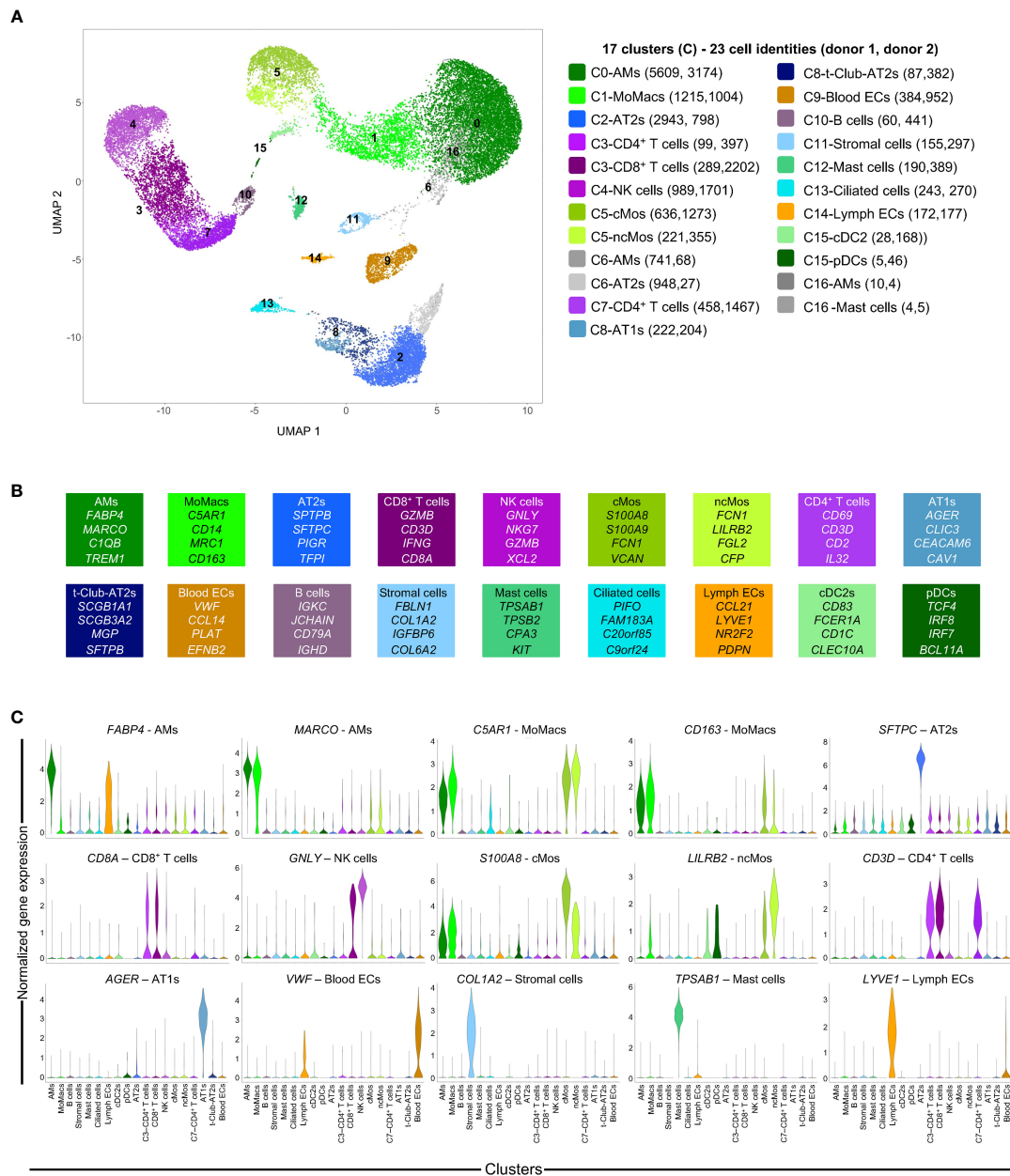


FIGURE 1

Single cell RNA-seq analysis of lung samples at 3 EVLP timing (0, 4, 10 h) and definition of cell identities. (A) The scRNA-seq data of the 6 samples (2 donors, 3 timings) were processed for high quality transcriptomes, integrated, clustered and submitted to cell annotation analysis with the Azimuth package (see [Additional file 2](#) and Methods). Cells with low annotation scores (< 0.6) and minor identities (<10% of a cluster) were excluded and the remaining cells were projected onto the “integrated UMAP-filtered” shown in A, with 17 clusters (C0 to C16, shown on the UMAP). Cell identities (23 in total) were determined by i) the belonging to a cluster of the “integrated UMAP-filtered” (Cx number), ii) the Azimuth-based annotation and iii) a grouping of “close cell subtypes” into a generic cell type annotation (see [Additional files 2, 6](#)). The 23 cell identities are each associated to a distinct color related to a dominant tint corresponding to major cell type family (green for myeloid, pink for lymphoid, blue for epithelial and stromal, gold for vascular cells); these colors will be kept in the subsequent figures. The scRNA-seq data are available on an interactive viewer (https://applisweb.vim.inrae.fr/Human_EVLP). The number of cells originating from donor 1 and donor 2 in each cell identity is reported between brackets. Ambiguous identities were excluded (C6-AMs, C6-AT2s, C16-AMs, C16-Mast cells) leading to 19 cell identities used for subsequent analyses. (B) Hallmark genes supporting the identification of the different cell identities were selected from the top expressed genes common to both donors ([Additional file 7](#)). (C) Violin plots showing the original level of expression of selected hallmark genes in the 19 cell identities of donor 2 (similar in donor 1).

(AT2s), C3-CD4⁺ T cells, C3-CD8⁺ T cells (CD8⁺ T cells), C4-NK cells (NK cells), C5-classical monocytes (cMos), C5-non-classical monocytes (ncMos), C6-AMs, C6-AT2s, C7-CD4⁺ T cells, C8-AT1s (AT1s), C8-transitional-Club-AT2 (t-Club-AT2s), C9-blood

endothelial cells (blood ECs), C10-B cells (B cells), C11-stromal cells (stromal cells), C12-mast cells (mast cells), C13-multi-ciliated epithelial cells (ciliated cells), C14-lymphatic endothelial cells (lymph ECs), CD15-conventional type 2 dendritic cells (cDC2s),

CD15-plasmacytoid dendritic cells (pDCs), C16-AMs and C16-mast cells. In the next analyses, we excluded C6-AMs/C6-AT2s and C16-AMs/C16-mast cells, due to their ambiguity; indeed despite the use of Scrublet to remove doublets in the data processing (see [Additional file 2](#) and Methods), these clusters included distant subtypes yet clustering together, and C16 included very few cells (<15 per donor). [Figure 1A](#) shows that the remaining 19 cell identities were represented in both donor data sets (see numbers in brackets), indicating that our experimental setting is not biased to a donor. In addition as shown in [Figures 1B, C](#), the cell type identity was confirmed by the expression of recognized hallmark genes ([14, 15](#)) that were found among the top expressed markers of our 19 cell identities ([Additional files 7, 8](#) for gene symbols), such as *FABP4* and *MARCO* in AMs, *C5AR1* and *CD163* in MoMacs, *S100A8* in cMos, *LILRB2* in ncMos, *CD1c* in cDC2s, *TPSAB1* in mast cells, *AGER* in AT1s, *SFTPC* in AT2s, *VWF* in blood ECs, *LYVE1* in lymph ECs, *COL1A2* in stromal cells, *GPLY* in NK cells, *CD3D* in CD8⁺ T cells and CD4⁺ T cells, and *CD8A* in CD8⁺ T cells as well as in C3-CD4⁺ T cells but not in C7-CD4⁺ T cells ([Additional files 7, 8](#)). Compared to C7-CD4⁺ T cells, C3-CD4⁺ T cells share more gene expression with CD8⁺ T cells as they cluster together, and expression of *CD8A* is known to be expressed by some activated CD4⁺ T cells ([16](#)). We calculated the percentage of representation of the cell identities for each donor during EVLP ([Additional file 9](#)). We found that a similar representation of the 19 identities was obtained over time, indicating that the cellular composition of the lung samples was not substantially modified by EVLP.

In the rest of our study, we grouped the analyses by cell type families i.e. epithelial (AT1s, AT2s, t-Club-AT2s, ciliated), endothelial (blood and lymph ECs), myeloid (AMs, MoMacs, cMos, ncMos, mast cells, cDC2s, pDCs), and lymphoid cell type families (CD4⁺ and CD8⁺ T cells, NK cells, B cells). The gene expression across cell type identities and clusters can be visualized with an interactive viewer (https://applisweb.vim.inrae.fr/Human_EVLP).

For each of the 19 cell identities obtained by our strategy based on Azimuth scoring and exclusion of minor identities and ambiguous clusters, we extracted differentially expressed genes (DEGs, adjusted p-value < 0.05, absolute fold change > 0.4 (Log2), [Additional file 10](#)) for each donor between 0 versus 4 h and 0 versus 10 h, for downstream functional enrichment analyses. DEGs were processed through Ingenuity Pathways Analysis (IPA), which predicts modulation of functions and pathways by integrating the orientation of gene expression modulation and a scientific literature-based curated database. We selected the meaningful pathways and functions that were predicted to be modulated similarly in both donors at least at one time point, and we systematically added the IPA functions designated as Inflammatory Responses, Inflammation of Lung, Apoptosis and Cell Viability. No consistent pathways/functions were found for stromal cells, t-Club-AT2s, ciliated cells, B-cells and pDCs, that were thus not considered for further analyses. In order to confirm and possibly complete the IPA analysis, we performed a high-throughput Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using BubbleMap applied to the Hallmark collection from the Molecular Signatures Database (MsigDB). GSEA performs statistical enrichment analyses using genesets mapped onto the

gene expression comparison between two timings, and hence is not restricted to the DEGs; in addition, IPA and GSEA use different knowledge-based annotations for a given function/pathway, leading to often similar but sometimes different results between the two approaches (see Discussion). The functional predictions inferred from the gene expression modulations will be detailed next for the different cell type families.

Lung epithelial cells during EVLP present gene pathways related to increased inflammation and decreased cytoskeleton signaling

As shown in [Figure 2A](#), functions/pathways related to inflammation were predicted by IPA to be activated in AT1 and AT2 cells. In particular, Chemotaxis and Migration of phagocytes were predicted to be stimulated in several instances (z-scores > 2), with upregulation of *CXCL2*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL20* and *CSF3* gene expression ([Figure 2A](#), [Additional file 11](#)). Viability was predicted activated at 4 h but tended to be reduced at 10 h in both cell types in link with stimulated Granzyme A Signaling and Mitochondrial Dysfunction, and reduction of Oxidative Phosphorylation, fatty acid and amino acid metabolisms and hormonal signaling. In parallel, Actin Cytoskeleton Signaling pathways were predicted downmodulated at 10 h, with reduced expression of actin family genes (*ACTB*, *ACTG1*, *ARPC1-5*), myosin genes (*MYO5C*, several *MYL*) as well as RHOA, a GTPase that controls cytoskeleton organization ([17](#)) ([Figure 2A](#), [Additional file 11](#)). GSEA confirmed an enrichment of Inflammatory Responses and TNF α Signaling via NF κ B, in association with reduction of Oxidative Phosphorylation as found in many inflammatory situations ([18](#)) ([Figure 2B](#)). Upregulation during EVLP of the Hypoxia geneset in AT2s implicated increased expression of oxidative stress genes, such as metallothionein (*MT1E*, *MT2A*) ([Additional file 12](#) for the leading edge genes of GSEA). Furthermore, the p53 pathway was upregulated at 4 h in AT2s, with implication of *GADD45A* whose transcript levels are increased following stressful growth arrest conditions. Regarding Apoptosis, IPA predicted significant downmodulation of the function at 4 h in the case of AT2 cells of donor 1 ([Figure 2A](#)) and GSEA pointed to a significant positive enrichment ([Figure 2B](#)) Explanations for this discrepancy will be discussed next (see Discussion). Therefore, no clear conclusion can be drawn regarding prediction of Apoptosis in AT2s.

Altogether our scRNA-seq data analysis indicates that epithelial cells upon EVLP engaged gene pathways related to increased inflammatory responses, and particularly at 10 h, gene pathways related to decreased cytoskeleton signaling and decreased general metabolism.

Blood endothelial cells show upregulation of gene pathways related to inflammation

We next examined the functional gene modules altered by EVLP in the endothelial cell family, i.e. blood ECs and lymph

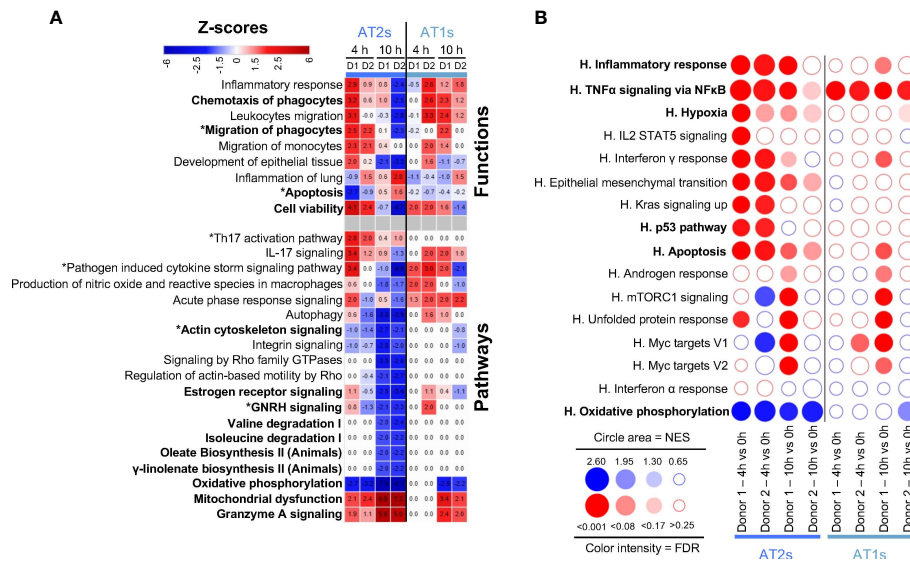


FIGURE 2

Computational inference of the changes induced by EVLP in lung epithelial cells. (A) The differentially expressed genes (DEGs, adjusted p-values $p < 0.05$, $\text{Log}_2\text{FC} > 0.4$) in alveolar type 2 (AT2s) and alveolar type 1 (AT1s) between 4 h vs 0 h and 10 h vs 0 h were submitted to Ingenuity Pathways Analysis. The pathways and functions that showed z-scores < -1.9 or > 1.9 consistently in both donors (D1, D2) at 4 h or 10 h are presented as a heatmap, with stop colors indicated on the scale. The z-score values are reported for each condition (donor, timing), with values < -2 or > 2 being considered by IPA as significantly predictive of inhibition or activation respectively. Functions/pathways in bold fonts are mentioned in the main text. The modulated expressions of the contributing genes to the functions/pathways marked with a star (*) are provided in [Additional file 11](#). (B) Bubblemap showing the Gene Set Enrichment Analysis performed on comparisons between 4 h vs 0 h and 10 h vs 0 h for AT2s and AT1s using the Hallmark (H) gene sets of the MSigDB. The leading edge genes that contribute the most to the enrichments are provided in [Additional file 12](#). The genesets enriched at 4 h or 10 h vs 0 h are represented as red bubbles when positively enriched and as blue bubbles when negatively enriched. The circle area is proportional to the Normalized Enrichment Score (NES) and the color intensity corresponds to the False Discovery Rate (FDR, significance < 0.25).

ECs (Figure 3). In blood ECs at 4 h, IPA predicted activation of Inflammatory Response (z-scores > 3 , reaching > 6 in several instances), such as Migration of phagocytes, Synthesis of eicosanoid, IL-17, and Pathogen Induced Cytokine Storm pathways (Figure 3A). The contributing genes to these pathways included many chemokine genes (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL14*), cytokine (*IL6*, *MIF*) and cytokine receptor (*IL1R1*) genes as well as eicosanoid synthesis genes (*PTGS2*) and coagulation-implicated genes (*PLAT*, *PLAUR*, *SERPINE1*), that were upregulated in both donors at 4 h as well as at 10 h in donor 1 and less so in donor 2 (Additional file 13). Genes associated to endothelial cell activation (19), such as *ICAM1* and *VCAM1* were upregulated and their protein shedding also increased with time in the perfusion liquid (Figure 3B). The Endothelin-1 and Signaling Apelin pathways, that are implicated in the control of vascular permeability (20), were also predicted to be modulated (Figure 3A). The GSEA analysis (Figure 3C) confirms the enrichment of TNF α Signaling via NF κ B and Inflammatory Responses in blood ECs and also in lymph ECs, although no clear prediction could be inferred from IPA in the latter cell type. As in the case of epithelial cells, no consistent conclusion from IPA and GSEA could be deduced regarding Apoptosis.

These data indicate that the gene expression profiles of blood ECs upon EVLP are associated with activation of inflammatory response and of Endothelin/Apelin pathways.

Lymphoid cells display gene pathways related to decreased activation, cytoskeleton signaling and migration

Gene expression changes in lymphoid cells were analyzed by IPA, i.e. in C3-CD4⁺ T cells and C7-CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, and NK cells. Similar IPA profiles were obtained with C3- and C7-CD4⁺ T cells, therefore only C7-CD4⁺ T cells (the dominant population) are shown in Figure 4A. IPA does not show prediction of activation of the Inflammatory Response pathway (z-score all < 2), in most cases in accordance with the GSEA analysis (Figure 4B). However GSEA points to enrichment of TNF α Signaling Pathway at 4 h in both donors; in that case, many of the leading edge genes were not statistically found as DEGs and thus not significantly/substantially upregulated (*IL18*, *IL23A*, *IL1A*, *NFKBIE*, *CCL2*, *SOD2*, *CXCL3*, *IL1B*, *NFKB2*, *RELB*, *VEGFA*, *MAFF*, *CXCL2*, *CCL20*, Additional files 10, 12). Inhibition of Activation and Cytotoxicity of lymphocytes was predicted with IPA, already at 4 h in several instances, and in all cases at 10 h, reaching low negative z-scores (< -4 , Figure 4A). Indeed the expression of several cytokine genes was reduced, i.e. *CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *IFNG*, as well as that of genes encoding key effector molecules (*GZMA*) and immune receptors (*CD3E*, *CD3G*, *TRBC1* and 2, Additional file 14). Accordingly no significant enrichment of IL2-Stat5 Signaling and of Interferon gamma response was consistently found with GSEA at 4 h and

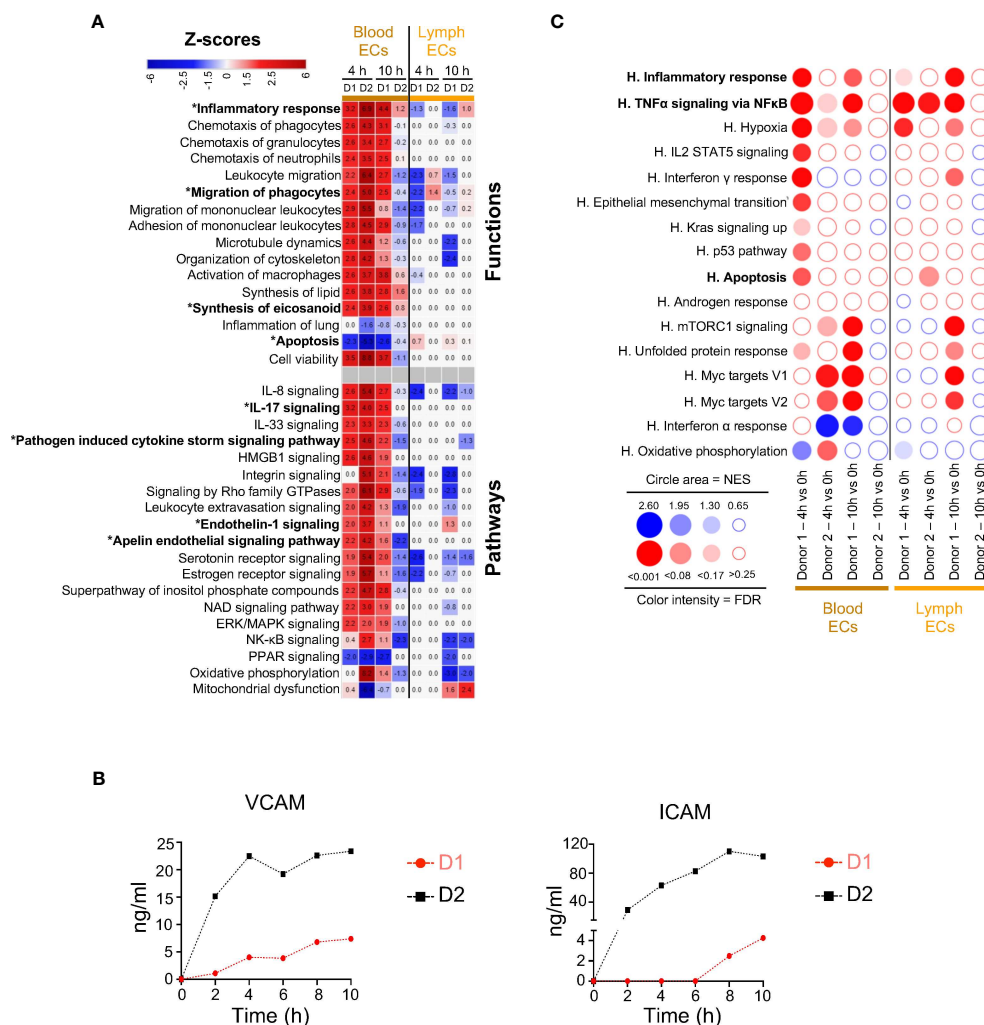


FIGURE 3 Computational inference of the changes induced by EVLP in endothelial cells (ECs). **(A)** The differentially expressed genes (DEGs, adjusted p -values < 0.05 , $\text{Log}_2\text{FC} > 0.4$) in the blood and lymph endothelial cells (ECs) between 4 h and 10 h vs 0 h were submitted to Ingenuity Pathways Analysis. The predicted pathways and functions are illustrated as in **Figure 2A**. Functions/pathways in bold fonts are mentioned in the main text. The modulated expressions of the contributing genes to the functions/pathways marked with a star (*) are provided in **Additional file 13**. **(B)** Dosage of soluble ICAM and VCAM in the perfusion liquids of donor 1 and 2 by ELISA. **(C)** Bubblemap showing the Gene Set Enrichment Analysis performed on comparisons between 4 h vs 0 h and 10 h vs 0 h for the endothelial cells, like done in **Figure 2B**. The leading edge genes that contribute the most to the enrichments are provided in **Additional file 12**.

both pathways tended to be downregulated at 10 h (**Figure 4B**). Importantly, the expression of genes involved in active suppressive functions were upregulated at 4 h in CD8^+ T cells, such as *TNFAIP3*, a de-ubiquitinase gene that inhibits functional activation of immune cells mediated through NF- κ B/STAT pathways (21), *SOCS1*, a negative regulator of cytokine receptors (22), and in some cases *CTLA4*, an immune checkpoint inhibitor (**Additional files 10, 14**). Actin Cytoskeleton Signaling and Integrin Signaling pathways were predicted by IPA to be reduced particularly at 10 h, in link with decreased migration properties (**Figure 4A**). The Cell Viability function of IPA showed negative z-scores particularly at 10 h, in link with predicted Mitochondrial dysfunction and reduced Oxidative Phosphorylation (**Figure 4A**). Yet no significant prediction for activation of apoptosis-related pathways could be retrieved from IPA nor from GSEA.

Altogether, the gene signatures of lymphoid cells appear mainly related to blunted activation during EVLP, with upregulation of suppressive immune genes and reduction of cytoskeleton signaling and cell mobility pathways.

Monocytic subsets and AMs show upregulation of gene pathways related to inflammatory processes whereas mast cells and cDC2s display predicted blunted activation

We finally conducted functional enrichment analysis on the six myeloid subtypes, i.e. AMs, MoMacs, cMos, nCMos, mast cells, cDC2s. Through IPA, AMs presented a predicted activated function

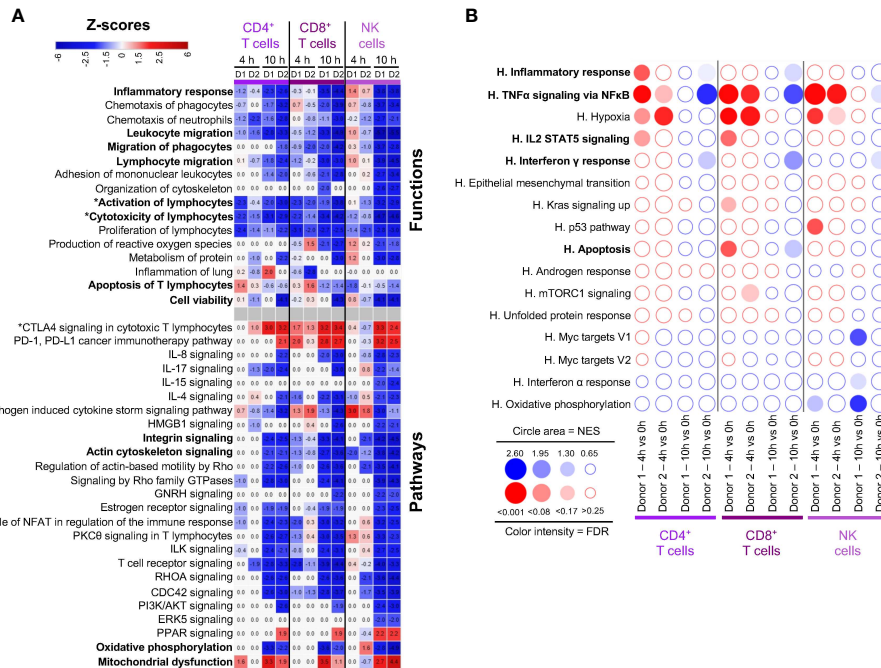


FIGURE 4 Computational inference of the changes induced by EVLP in lymphoid cells. **(A)** The differentially expressed genes (DEGs, adjusted p -values $p < 0.05$, $\text{Log}_2\text{FC} > 0.4$) in the C7-CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells between 4 h and 10 h vs 0 h were submitted to Ingenuity Pathways Analysis. The predicted pathways and functions are illustrated as in **Figure 2A**. Functions/pathways in bold fonts are mentioned in the main text. The modulated expressions of the contributing genes to the functions/pathways marked with a star (*) are provided in **Additional file 14**. **(B)** Bubblemap showing the Gene Set Enrichment Analysis performed on comparisons between 4 h vs 0 h and 10 h vs 0 h for the lymphoid cells, like done in **Figure 2B**. The leading edge genes that contribute the most to the enrichments are provided in **Additional file 12**.

of Attraction of Phagocytes at 4 h, implicating the upregulation of *CCL20*, *CXCL5*, *IL6* and *IL1B* genes in both donors at 4h that was dampened at 10 h (**Figure 5A**, **Additional file 15**). Consistently, GSEA showed a significant enrichment of the Inflammatory Response and TNF α Signaling via NF κ B at 4 h and not at 10 h (**Figure 5B**). Through IPA, MoMacs and cMos displayed a predicted participation to Inflammation of Lung merely at 10 h, with upregulated expression of IL-1 β related genes (*IL1B*, *IL1R1*, *IL1RL1*), eicosanoid synthesis gene (*PTGS2*) and *CXCL3* gene (**Figure 5A**, **Additional file 15**). GSEA also showed enrichment of the inflammatory pathways at 10 h in MoMacs and a tendency in Mos (**Figure 5B**). IPA predicted in most instances the reduction of Macrophage Classical Activation Signaling Pathways, IL-17 and Interferon Signaling, Organization of cytoskeleton, Phagocytosis, Binding of Leukocytes and Migration, hormone-driven pathways, often already at 4 h and in almost all cases at 10 h. In particular the expression of integrin genes was downmodulated (*ITGB1*, *ITGB2*, *ITGA4*), as well as that of vimentin (*VIM*), and tetraspanin (*CD37*) (**Additional file 15**). The prediction of engagement of gene pathways related to Apoptosis was again not consistent between IPA and GSEA (see discussion). Particularly at 10 h, IPA predicted reduction of Viability and reduction of Oxidative Phosphorylation as confirmed by GSEA that also pointed to reduction of MYC target and Interferon Alpha Response pathways. Mast cells and ncMos did not present a clearly predicted participation to inflammatory functions and their functions were essentially predicted to be inhibited.

Despite that DEGs could not be retrieved in the case of the cDC2s of donor 1 at 10 h due to too few cells, we decided to investigate the functional genomic results of this major cell subtype involved in orchestration of immunity. Reduction of cell activation and maturation appeared to apply to cDC2s, at 4 h and 10 h in donor 2, and following the same trend at 4 h in donor 1. Notably, *CD83*, and several genes encoding for MHC class 2 proteins (*HLA-DR*, *-DQ* and *-DP*), *CD1D*, *IL1B* and *IL18* were downmodulated. Similarly GSEA confirmed that cDC2 tended to downregulation of most pathways upon EVLP.

Collectively our data indicate that myeloid cells differentially responded to EVLP: AMs transiently upregulated inflammatory pathways at 4 h only, MoMacs and cMos upregulated inflammatory gene pathways particularly at 10h, and ncMo, mast cells and cDC2 essentially showed dampened activation upon EVLP. In all our analyzed myeloid subsets, organization of cytoskeleton and migration were predicted to be reduced particularly at 10 h.

Relative contribution of cell types to the cytokine and chemokine transcript synthesis during EVLP

The inflammatory response revealed to be a dominant function induced upon EVLP in several cell types. This activated function was reflected by the production of cytokines and chemokines in the perfusion liquid (IL-1 β , *CXCL8*, TNF α , IL-6), that accumulated

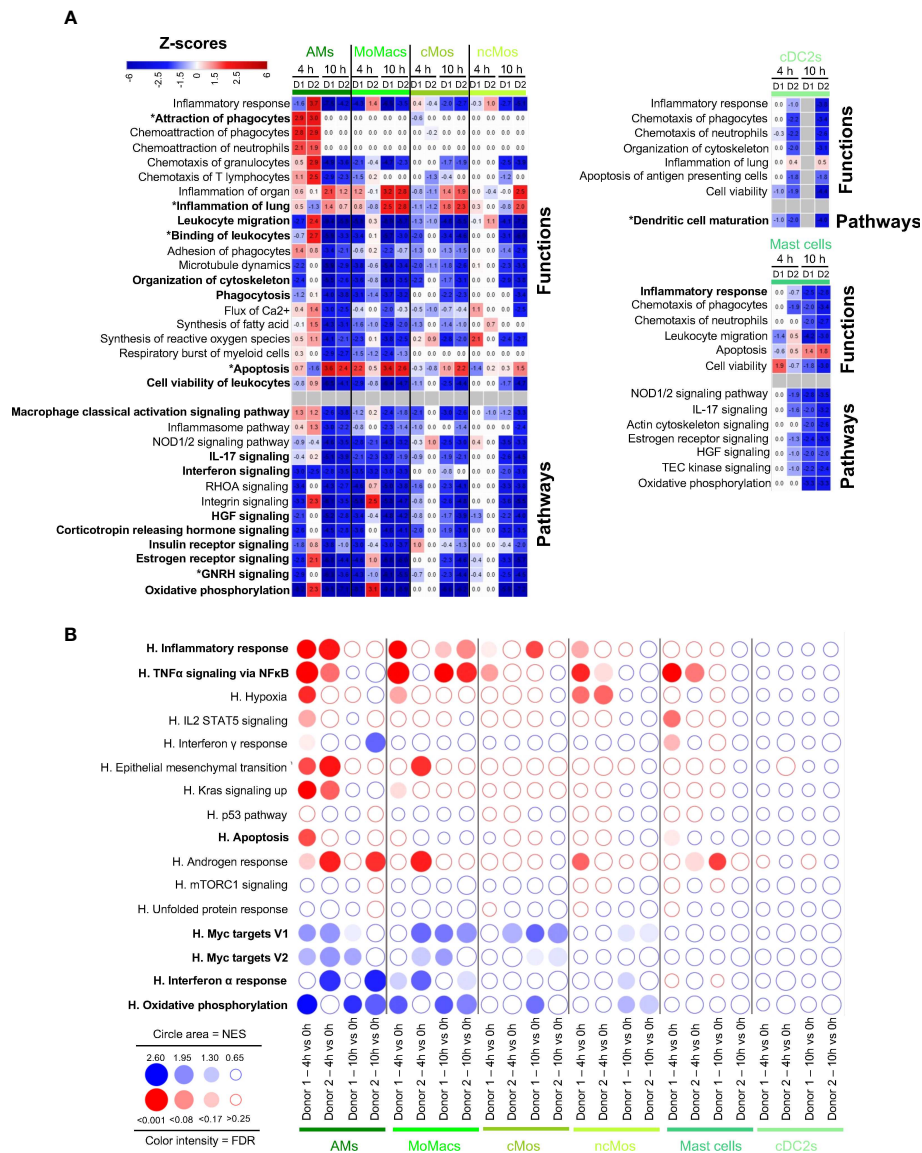


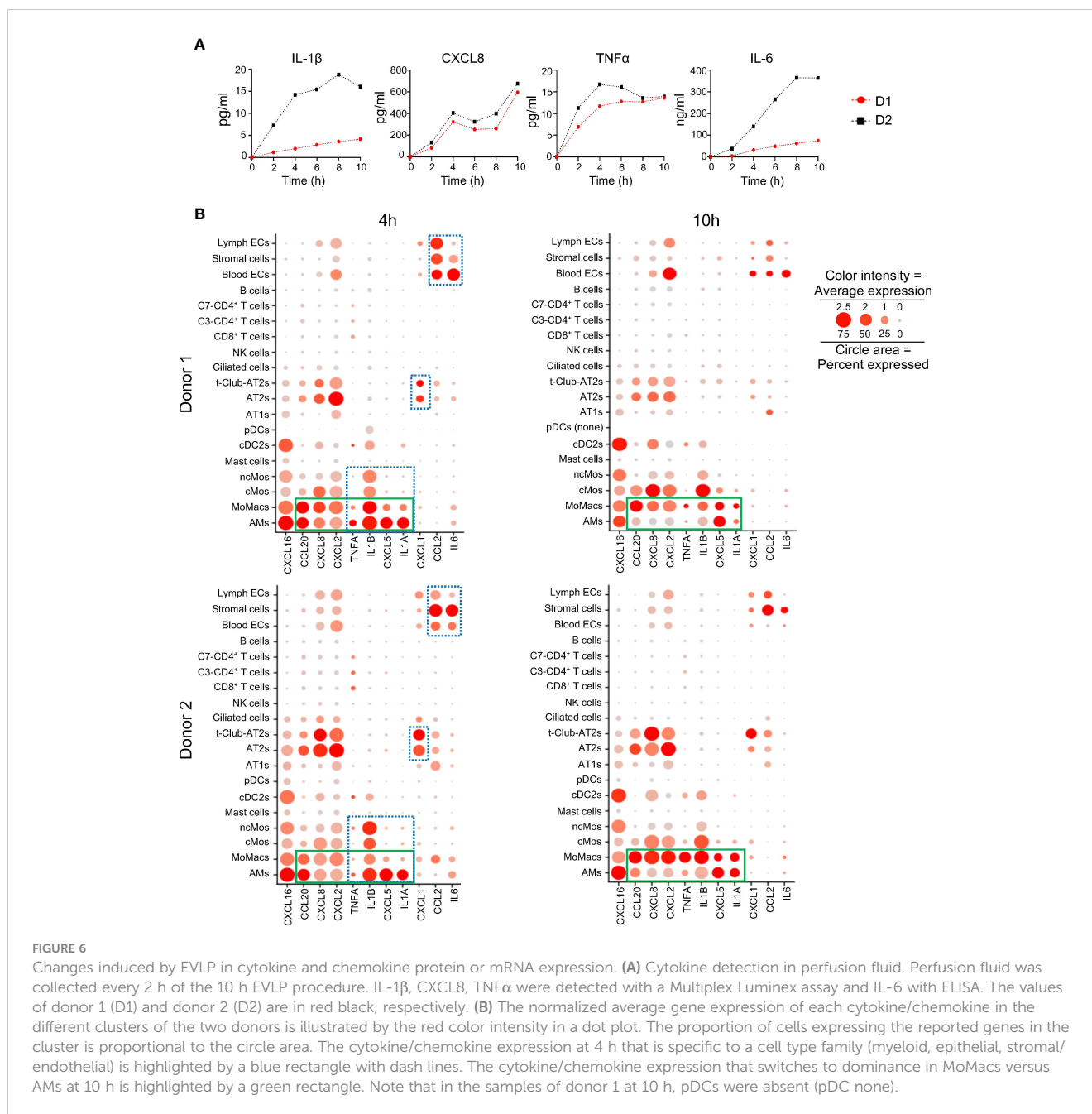
FIGURE 5 Computational inference of the changes induced by EVLP in myeloid cells. **(A)** The differentially expressed genes (DEGs, adjusted p-values $p < 0.05$, $\text{Log}_2\text{FC} > 0.4$) in alveolar macrophages (AMs), monocyte-derived-macrophages (MoMacs), classical monocytes (cMos), non-classical monocytes (ncMos), mast cells and conventional type 2 dendritic cells (cDC2s) between 4 h and 10 h vs 0 h were submitted to Ingenuity Pathways Analysis. The predicted modulated pathways and functions are illustrated as in **Figure 2A**. Functions/pathways in bold fonts are mentioned in the main text. The modulated expressions of the contributing genes to the functions/pathways marked with a star (*) are provided in **Additional file 15**. **(B)** Bubblemap showing the Gene Set Enrichment Analysis performed on comparisons between 4 h vs 0 h and 10 h vs 0 h of myeloid cell types, like done in **Figure 2B**. The leading edge genes that contribute the most to the enrichments are provided in **Additional file 12**.

overtime despite perfusion fluid replacement during the process (**Figure 6A**). The absolute average expression values of cytokine and chemokine genes (**Figure 6B**, dotted blue squares) indicate selective expression per cell type families particularly at 4 h; for instance *TNFA*, *IL1B*, *CXCL5* and *IL1A* were mainly expressed by monocyte/macrophages, *CXCL1* by epithelial cells, *CCL2* and *IL6* by vascular cells and stromal cells. *CXCL2*, *CXCL8*, *CXCL16* and *CCL2* genes were expressed by most cell types except by lymphoid cells. Notably the expression of *CCL20*, *CXCL8*, *CXCL2*, *TNFA*, *IL1B*, *CXCL5* and *IL1A* show a dominant expression in MoMacs as compared to AMs at 10 h (**Figure 6B**, green square).

These results show that lung cell types display a division of labor for the selective expression of cytokine/chemokine genes that varies with time during EVLP.

Discussion

By performing a thorough scRNA-seq analysis focusing on the common responses of two lung donors undergoing EVLP, we showed that EVLP induces changes in the expression of genes involved in inflammation and cytoskeleton signaling/organization,



depending on cell types and timing. Inflammatory functions were predicted to be induced in epithelial cells, blood endothelial cells, MoMacs and transiently in AM at 4 h. Globally, NK cells, T-cells, mast cells, ncMos and cDC2s displayed absent or reduced activation. Reduction of cytoskeleton signaling/organization appeared in most cell types mainly at 10 h associated with a prediction for reduced migration properties in lymphoid and myeloid cells. This latter result may explain the reduction of passenger leukocyte transfer encountered after transplantation of lungs treated with EVLP (23). As rapid transfer of passenger leukocytes is known to promote acute cellular rejection (23), this reduction of migration, together with the global downmodulation of activation in cDC2s and lymphoid cells, might stand as a positive effect of EVLP. Indeed several papers suggest that LT with EVLP

leads to better clinical outcomes, although this statement needs to be confirmed with additional clinical studies (24–26).

In most instances, the IPA and GSEA approaches gave consistent results except in the case of Apoptosis, a form of non-inflammatory and controlled cell death. The discrepancy can be explained by i) the differences (in terms of numbers and identities) of the Apoptosis genes found in the IPA-knowledge database (4597 genes) and in MSigDB (161 genes) and ii) the difference of methodologies that involves DEGs in IPA and ranked gene expression in GSEA (see Additional file 16). For example, in monocytes/macrophages at 10 h EVLP, most IPA Apoptosis-contributing genes are not taken into account in the GSEA analysis because only a minority of the IPA genes (8 to 12%) is present in the Hallmark Apoptosis gene set (Additional file 16).

Reciprocally in AT2s and blood ECs at 4 h EVLP, a majority of the genes found in the GSEA Apoptosis leading edges with positive enrichment (about 60%) are not DEGs and thus not taken into account in the IPA analysis. Finally IPA results are expected to be more robust because, at the difference with the Hallmark Apoptosis gene set that includes both pro-apoptosis (*BAX*, *CASP1 to 9*) and anti-apoptosis (*BCL2L1*, *BCL2L10*, *BCL10*) genes, IPA takes into account the pro- and anti-apoptotic functions and their orientation of expression in our data set. In any event, complementary analyses should be conducted in additional studies to conclude about the possible activation of apoptosis in specific cell subsets upon EVLP according to its duration. Notably based on IPA, Cell Viability appeared activated at 4 h in AT1s, AT2s and blood ECs, but reduced at 10 h in most cell types (Figures 2, 3).

EVLP is associated to an ischemia-reperfusion-like response, inherent to lung retrieval and preservation followed by a reperfusion process at normothermia (27). Secondly the intensive care unit ventilators currently used in EVLP are proposed to induce positive pressure ventilation-induced lung injury which results from an interplay of cell responses to supra-physiological mechanical forces (28). Both phenomena may be involved in inducing the EVLP inflammatory response via the implication of alveolar and vascular cells as revealed by this study. We propose that the inflammatory response expressed by these cell types triggers the oedema that occurs upon prolonged EVLP. Indeed inflammation is known to drive perturbations of cytoskeleton signaling that was found in AT2s for instance, and alteration of cytoskeleton signaling is a master regulator mediating disruption of junctions and creation of leaky barriers (17). In addition the activation of the endothelin pathway that was inferred from gene expression modulation in blood ECs may also contribute to an increased blood vessel permeability and thus to oedema formation (20).

The magnitude of the inflammatory response during EVLP correlates with worse outcome after lung transplantation in patients (5, 29). Indeed CXCL8 and CXCL1 protein levels in the EVLP perfusate were previously shown to correlate with occurrence of PGD (5). In addition, an inflammation score based on CXCL8 and IL-6 expression in the perfusate during EVLP was also correlated with PGD ($p=0.03$) (29). The genes encoding for these cytokines were upregulated in the endothelial, epithelial and mononuclear phagocyte compartments in our study (Additional file 17), with major producers being epithelial cells for *CXCL1* and endothelial and stromal cells for *IL6* (Figure 6B). These cytokine responses could be modulated through treatments targeting the right cell compartments. First, the deleterious effects of positive pressure ventilation could be controlled through development of negative pressure ventilation, which was recently shown to reduce inflammatory responses in EVLP (30). We are currently evaluating the impact of positive versus negative pressure ventilation on EVLP using scRNA-seq, in order to provide mechanistic insight in the lung cell response to mechanical forces, and potentially identify specific pathways and specific cell targets. Secondly, the additional use of anti-inflammatory regimens, delivered in the perfusate and in the airways, could complement the methylprednisolone that is used as a standard of care and does not suffice to control the inflammatory response as shown here.

Promising results were obtained with vectorized IL-10 (7), 1-anti-trypsin (31), Pyrrolidine dithiocarbamate (an inhibitor of NF- κ B) (32) and mesenchymal stem cells (33). Interestingly our results also indicate that gene pathways related to hormonal signaling are decreased in several cell types (epithelial, myeloid, lymphoid families) particularly at 10 h. Therefore addition of hormones, the nature of which remains to be evaluated, might mitigate the response to EVLP. Importantly the scRNAseq-based workflow that we designed here with unbiased lung cell-type identification and functional genomics analyses constitutes a powerful approach to evaluate the effects of new treatments during EVLP that could be applied both on the airway and vascular compartments.

Our results point to the added value of scRNA-seq versus bulk RNA-seq approaches. Activation of gene expression related to inflammatory responses has been identified in EVLP with bulk approaches (12, 13). However, the bulk approach led to conclude that prolonged EVLP resolved the inflammatory response, with circulating leukocyte cell-specific gene expression dropping down, suggesting a washout of circulating leukocytes (12). In contrast, our scRNA-seq results show that the representation of the leukocyte clusters is stable over time and that expression of leukocyte integrins are reduced with EVLP duration (Additional file 10), supporting gene downmodulation rather than cell subset emigration.

A limitation of our study resides in the use of only two donors. This is because of (i) the difficulty to access to lungs in good physiological conditions, with a schedule compatible with availability of all the team members required to launch the EVLP and harvest the cells at the 3 time points chosen (0h, 4h and 10h), and (ii) cost of the experiments. However, we believe that this limitation has been overcome by the depth and rigor of our functional genomic study of the lung cell subset responses according to EVLP duration. Indeed, we implemented a specific data integration strategy to correct for batch effects and focused on the commonalities of the EVLP response, shared between the two donors. This enabled us to reveal the essence of the core cellular response to EVLP, while systematically illustrating the corresponding individual gene responses of the two donors. The predicted modulation of functions and pathways in the lung cell types sometimes presented different temporality and different levels of IPA z-scores between the two donors. For instance, in AT2s and blood ECs, the Inflammatory Response appeared less sustained in donor 2 than in donor 1 (Figures 2, 3). We also limited our analysis to 3 time points; gene expression in some of the lung cell subsets may follow different changes at other timings. In addition, the conventional method of lung transplantation implies cold storage of the whole organ, that can also alter RNA expression as shown for kidney in a pig model for instance (34). Comparison between EVLP and cold storage of same durations would be interesting to perform in order to strengthen the conclusion that the gene modulations that we observed are indeed specific of EVLP. Finally, we can speculate that reduction of costs of scRNA-seq experiments in the future will allow performing robust correlation studies between modulation of gene expression in specific subsets and donor characteristics or transplantation outcomes.

Altogether our study shows that scRNA-seq is a fruitful approach to provide refined knowledge on the biological response of organs undergoing normothermic *ex vivo* perfusion, at the cell type level. This workflow could be followed to finely analyze the effects of treatments during EVLP, such as negative ventilation, anti-inflammatory and immunomodulatory regimens, on the response of key cell subsets. Exploiting the scRNA-seq approach will help to get the highest benefit of EVLP with the goal of improving lung transplantation results.

Material and methods

Study design and *ex vivo* lung perfusion procedure

This study was approved by the Agence de la Biomédecine and by the Ministère de l'éducation nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation under the number 2020-007, as well as by the ethic committee of the Foch Hospital (IRB00012437). The two donor lungs used in this study to generate 6 scRNA-seq samples were from donation after brain death and were determined to be unsuitable for transplantation (Additional file 1). The main reason for decline were absence of recipient (AB+ blood group) for donor 1 and age for donor 2. The respiratory functions of the two lungs during EVLP is reported on Additional file 1. Donor lung retrieval was carried out according to current clinical practice using Perfadex (Vitrolife, Göteborg, Sweden) flush preservation. After transportation at 4°C, lungs were processed to EVLP that was conducted according to the Toronto protocol for 10 h at the Foch Hospital (Suresnes, France) (35). The circuit was filled with 1.5 L of Steen solution supplemented with 1 g methylprednisolone, 1 g cefuroxime, and 15000 UI heparin. A flow rate at 40% of the theoretical cardiac output was applied at normothermia. Steen perfusate (200 ml) was replaced with fresh one every 2 h.

Sampling

Perfusates were collected every 2 hours and frozen at -80°C for cytokine detection. Lung biopsies (2 g each) were taken from similar lung zones from the upper lobes (wedges) just before EVLP (0 h), after 4 and 10 h EVLP, cut in 4 pieces, placed in 10 ml HypoThermosol® (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) and kept on ice for about 24 h. This process was shown to maintain lung tissue stability up to 72 h for scRNA-seq (36).

Detection of cytokines, VCAM and ICAM in perfusion liquid

Perfusates were thawed and briefly centrifuged. VCAM1 was measured by a Human VCAM-1 Picokine™ ELISA kit (Boster Biological Technology Co., Ltd., Pleasanton, CA), ICAM1 by the Human ICAM-1/CD54 allele-specific Quantikine ELISA kit (R&D

Systems, Inc., Minneapolis, MN) and IL-6 by the LEGEND MAX™ Human IL-6 ELISA kit (BioLegend, San Diego, CA) according to each manufacturer's instructions. IL-1β, CXCL8, CXCL10 and TNFα were assessed with a Human ProcartaPlex™ Mix&Match 4-plex (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) using a MagPix instrument (Luminex, Austin, TX) and the data were analyzed with the Bio-Plex Manager software (Bio-Rad, Hercules, CA).

Single cell suspensions from lung biopsies

Lung tissue from biopsies kept in HypoThermosol was minced finely with scissors, placed in Multi Tissue Dissociation Kit 1 solution as recommended by the manufacturer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and incubated at 37°C for 45 min in gentle agitation. The minced preparation was crushed on nylon mesh (1 mm) and filtered through successive nylon filters (500 μm, 100 μm, 40 μm). The cell suspension was washed in PBS (470 g, 15 min), processed to erythrocyte lysis, resuspended in RPMI + 2% FCS, filtered twice on 40 μm and counted by 3 independent measurements with a counting Malassez chamber slide. Trypan blue staining indicated that over 90% cells were viable.

scRNA-seq and analysis of sequencing data

Fresh single-cell suspensions (2 x 10⁴ cells) were loaded onto the 10x Chromium to produce sequencing libraries, which were processed according to methods provided by 10x Genomics (v3 Chemistry). Cell cDNA was sequenced using the Truseq Illumina Stranded protocol and the Illumina NextSeq 550 sequencing machine (> 3x10⁸ reads/sample). The reads were aligned with Cell Ranger v3.1.0 on the human genome using the GRCh38 assembly and the GTF file downloaded from Ensembl release 101. The 6 samples (3 times points, 2 donors) were pre-processed and normalized together using Seurat v4.3.0. Cells expressing less than 1000 genes were removed. Dead or lysed cells were excluded by removing cells with a percentage of mitochondrial genes above a threshold calculated using the Scater package (median percentage of mitochondrial genes across all individual cells + 3 median absolute deviations). Filtration of the data also included the removal of doublets using Scrublet (<https://github.com/AllonKleinLab/scrublet> (37), expected doublet rate set to 0.08), see Additional files 3 and 4 for the details on the filtering procedure and the quality check features.

Clustering strategies

The clustering process, annotation and downstream analyses are summarized in a workflow figure (Additional file 2). We first combined the scRNA-seq data of each donor (3 time points) and proceeded to a graph-based clustering resulting in an UMAP named "time-combined UMAP" (see Additional file 5) that included 18 clusters for each donor. In order to correct for the donor and time effect, we anchor-integrated the data of the 6

samples (2 donors and 3 time points) using the FindIntegrationAnchors and IntegrateData functions in Seurat and we produced the “integrated UMAP” (Additional file 6A). Cells were preprocessed as described above. Parameters of the dimensionality reduction and graph-based clustering were adjusted to obtain 17 clusters in the “integrated UMAP” (Additional files 3, 6A). Note that the anchor integration procedure was used only for integration of the 6 samples and assignment of cells to clusters. All downstream analyses use the expression values normalized for each donor separately, in order to avoid the data transformation linked to the anchor integration.

Definition of cell identities in the scRNA-seq data sets

The original cell x gene matrix of each donor were pre-processed and normalized separately as described above and cells were assigned the cluster number of the “integrated UMAP”. Each donor dataset was then analyzed with Azimuth, an automated reference-based algorithm for single-cell annotation (<https://azimuth.hubmapconsortium.org/>, version 2.0.0), using the Human Lung Cell Atlas as a core consensus reference model which encompasses 584,884 human cells of the lung and nose. The finest level of annotation was used. Cells presenting Azimuth annotation scores below 0.6 were discarded. The remaining cells were hence associated to both a cluster number and a cell identity. In order to generate robust downstream analyses, the cell identities representing less than 10% of the associated cluster were eliminated for the subsequent analyses (Additional file 6). The cells selected with this Azimuth annotation-based process were projected onto the “integrated UMAP-filtered”, illustrated in Figure 1A. The final cell identities were based on i) their belonging to a cluster of the integrated UMAP, ii) their Azimuth-based annotation (> score 0.6) and iii) a grouping of “close cell subtypes” in the cases of the B lymphocytes (B cells, plasma cells), stromal cells (smooth muscle, adventitial and alveolar fibroblasts) and blood endothelial cells (arterial, aerocyte capillary, general capillary, venous systemic, venous pulmonary). Twenty three identities were thus obtained, from which we eliminated the C6 and C16 clusters, due to their ambiguity, leading to 19 final identities, i.e. C0-AMs, C1-MoMacs, C2-AT2s, C3-CD4⁺T, C3-CD8⁺T, C4-NK cells, C5-cMos, C5-ncMos, C7-CD4⁺ T cells, C8-AT1s, C8-transitional Club AT2, C9-blood ECs, C10-B cells, C11-stromal cells, C12-mast cells, C13-multi-ciliated, C14-lymphatic ECs, CD15-cDC2, CD15-pDC. The top markers of the 19 analyzed cell identities found in the “integrated UMAP-filtered” were extracted separately for each donor, using the normalized expression values of each dataset before integration [1000 top marker genes per cell identity versus the other identities (minimal log₂FC>=0.8, Bonferoni adjusted p-value<0.05)]. The two lists were then merged into a single list to keep only common markers to both donors, ranked in a decreasing order using the lowest gene expression fold change between the two donors (Additional file 7).

Generation of differentially expressed genes

Genes differentially expressed (absolute log₂FC>0.4, Bonferoni adjusted p-value<0.05) between cells from the same identity at 0 h vs 4 h and 0 h vs 10 h were extracted using the FindMarkers function in Seurat applied on the data normalized separately for each donor (Additional file 10). The fold change cut-off was established to comply to Ingenuity pathway analysis that recommends 200 to 3000 DEGs.

Ingenuity pathway analysis

The DEG lists were submitted to IPA software on the IPA knowledge database restricted to immune cells, epithelial, endothelial and fibroblasts, with stringent filters, according to IPA Ingenuity Web Site, www.ingenuity.com. We selected the meaningful pathways and functions with z-scores > 1.9 or < -1.9) in the two donors at least at one time point for each cell type family. The z-score values are systematically reported on Figures. IPA considers that z-scores > 2 or < -2 correspond to function/pathways that are significantly predicted to be up- or down-modulated respectively. In all cases, apoptosis, cell viability, inflammation of lung and inflammatory response functions were additionally selected. For the most pertinent modulated functions or pathways, we illustrated the fold changes of the contributing genes (Additional files 11, 13-15).

GSEA results and BubbleGUM-based illustrations

To better characterize the gene expression changes that occurred upon EVLP using an alternative method to IPA, we applied high-throughput GSEA with the BubbleMap module of the BubbleGUM software (38) on the scRNA-seq data normalized separately for each donor, comparing 0 h vs 4 h and 0 h vs 10 h. We used the Hallmark (H) geneset collection from the Molecular Signatures Database [MSigDB v2023, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp> (39)]. The retrieved annotations were selected based on two criteria: i) a false discovery rate (FDR) < 0.1 in GSEA and ii) a consistent and significant enrichment common to the two donors at least at one time point across all cell type identities. The leading edge genes that contribute the most to the enrichments are provided in Additional file 12. A correction for multiple testing across cell identities and conditions was applied in the frame of BubbleMap.

Statistical analyses

The biostatistics tests used in this study are included in the DEG, IPA and GSEA sections.

Data availability statement

The raw data obtained from the Cell Ranger analysis have been deposited on the Gene Expression Omnibus repository of the NCBI, under the accession number GSE218788. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE218788>.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Agence de la Biomédecine and by the Ministère de l'éducation nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation under the number 2020-007, as well as by the ethic committee of the Foch Hospital (IRB00012437). Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

Author contributions

Conceptualization, IS-C and ES, Legal aspects and authorization, ES, Resources, ES, Investigation with surgery, JW, MG, JE, MLG., Investigation with tissue and cell processing, CG, CU, BC, CC, DD, IS-C., Investigation with bank construction, CB, CG, CU, IS-C, Software and Formal analysis using Bio-statistics and informatics, T-PM, LJ, LH, Formal analysis, MD, T-PM, LJ, LH, CG, IS-C. Visualization, CG, IS-C, LJ, T-PM, Writing – original draft IS-C, Writing edits T-PM, MD, Supervision, IS-C, MD, T-PM Project administration, IS-C, ES, AR, AM, Funding acquisition, IS-C and ES. “All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The work was financed by the Fondation pour la Recherche Médicale and Bettencourt-Schueller foundation upon the selection by the Flash ANR COVID-19 call, la “Chaire Universitaire de

References

1. Possoz J, Neyrinck A, Van Raemdonck D. Ex vivo lung perfusion prior to transplantation: an overview of current clinical practice worldwide. *J Thorac Dis* (2019) 11(4):1635–50. doi: 10.21037/jtd.2019.04.33
2. Watanabe T, Cypel M, Keshavjee S. Ex vivo lung perfusion. *J Thorac Dis* (2021) 13(11):6602–17. doi: 10.21037/jtd-2021-23
3. Niikawa H, Okamoto T, Ayyat KS, Itoda Y, Farver CF, McCurry KR. The protective effect of prone lung position on ischemia-reperfusion injury and lung function in an ex vivo porcine lung model. *J Thorac Cardiovasc Surg* (2019) 157(1):425–33. doi: 10.1016/j.jtcvs.2018.08.101
4. Yeung JC, Krueger T, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre AF, Waddell TK, et al. Outcomes after transplantation of lungs preserved for more than 12 h: a retrospective study. *Lancet Respir Med* (2017) 5(2):119–24. doi: 10.1016/S2213-2600(16)30323-X

Transplantation Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, Hôpital Foch”, and INRAE institutional support.

Acknowledgments

This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing core facility of I2BC (Centre de Recherche de Gif – <http://www.i2bc.paris-saclay.fr/>) ». We warmly thank Nathalie Peynot (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, Jouy-en-Josas) for her precious help in the cDNA bank generation. We thanks the CIML CB2M group for their technical and methodological support in bioinformatics analyses and Valentin Loux (Université Paris-Saclay, INRAE, Maiage, Jouy-en-Josas) and Patrice Dehais (INRAE, Sigene, Toulouse) for their help regarding easy access to the viewer.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1142228/full#supplementary-material>

5. Machuca TN, Cypel M, Yeung JC, Bonato R, Zamel R, Chen M, et al. Protein expression profiling predicts graft performance in clinical ex vivo lung perfusion. *Ann Surg* (2015) 261(3):591–7. doi: 10.1097/SLA.0000000000000974
6. Nakajima D, Liu M, Ohsumi A, Kalaf R, Iskender I, Hsin M, et al. Lung lavage and surfactant replacement during ex vivo lung perfusion for treatment of gastric acid aspiration-induced donor lung injury. *J Heart Lung Transplant* (2017) 36(5):577–85. doi: 10.1016/j.healun.2016.11.010
7. Cypel M, Liu M, Rubacha M, Yeung JC, Hirayama S, Anraku M, et al. Functional repair of human donor lungs by il-10 gene therapy. *Sci Transl Med* (2009) 1(4):4ra9. doi: 10.1126/scitranslmed.3000266
8. Wang X, Wang Y, Parapanov R, Abdelnour E, Gronchi F, Perentes JY, et al. Pharmacological reconditioning of marginal donor rat lungs using inhibitors of peroxynitrite and poly (Adp-ribose) polymerase during ex vivo lung perfusion. *Transplantation* (2016) 100(7):1465–73. doi: 10.1097/TP.0000000000001183

9. Sadaria MR, Smith PD, Fullerton DA, Justison GA, Lee JH, Puskas F, et al. Cytokine expression profile in human lungs undergoing normothermic ex-vivo lung perfusion. *Ann Thorac Surg* (2011) 92(2):478–84. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.04.027
10. Hashimoto K, Cypel M, Juvet S, Saito T, Zamel R, Machuca TN, et al. Higher M30 and high mobility group box 1 protein levels in ex vivo lung perfusate are associated with primary graft dysfunction after human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* (2017) 37:240–9. doi: 10.1016/j.healun.2017.06.005
11. Baciuc C, Sage A, Zamel R, Shin J, Bai XH, Hough O, et al. Transcriptomic investigation reveals donor specific gene signatures in human lung transplants. *Eur Respir J* (2020) 57(4). doi: 10.1183/13993003.00327-2020
12. Yeung JC, Zamel R, Klement W, Bai XH, Machuca TN, Waddell TK, et al. Towards donor lung recovery—gene expression changes during ex vivo lung perfusion of human lungs. *Am J Transplant* (2018) 18(6):1518–26. doi: 10.1111/ajt.14700
13. De Wolf J, Glorion M, Jouneau L, Estephan J, Leplat JJ, Blanc F, et al. Challenging the ex vivo lung perfusion procedure with continuous dialysis in a pig model. *Transplantation* (2021) 106(5):979–87. doi: 10.1097/TP.0000000000003931
14. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* (2020) 587(7835):619–25. doi: 10.1038/s41586-020-2922-4
15. Sikkema L, Ramirez-Suastegui C, Strobl DC, Gillett TE, Zappia L, Madisson E, et al. An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med* (2023). doi: 10.1038/s41591-023-02327-2
16. Macchia I, Gauduin MC, Kaur A, Johnson RP. Expression of Cd8alpha identifies a distinct subset of effector memory Cd4+ T lymphocytes. *Immunology* (2006) 119(2):232–42. doi: 10.1111/j.1365-2567.2006.02428.x
17. Lechuga S, Ivanov AI. Actin cytoskeleton dynamics during mucosal inflammation: a view from broken epithelial barriers. *Curr Opin Physiol* (2021) 19:10–6. doi: 10.1016/j.cophys.2020.06.012
18. O'Neill LA, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* (2016) 16(9):553–65. doi: 10.1038/nri.2016.70
19. Hashimoto K, Cypel M, Kim H, Machuca TN, Nakajima D, Chen M, et al. Soluble adhesion molecules during ex vivo lung perfusion are associated with posttransplant primary graft dysfunction. *Am J Transplant* (2017) 17(5):1396–404. doi: 10.1111/ajt.14160
20. Filep JG. Endothelin peptides: biological actions and pathophysiological significance in the lung. *Life Sci* (1993) 52(2):119–33. doi: 10.1016/0024-3205(93)90131-1
21. Xuan NT, Wang X, Nishanth G, Waisman A, Borucki K, Isermann B, et al. A20 expression in dendritic cells protects mice from lps-induced mortality. *Eur J Immunol* (2015) 45(3):818–28. doi: 10.1002/eji.201444795
22. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. Socs proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* (2007) 7(6):454–65. doi: 10.1038/nri2093
23. Stone JP, Critchley WR, Major T, Rajan G, Risnes I, Scott H, et al. Altered immunogenicity of donor lungs via removal of passenger leukocytes using ex vivo lung perfusion. *Am J Transplant* (2016) 16(1):33–43. doi: 10.1111/ajt.13446
24. Boffini M, Ricci D, Bonato R, Fanelli V, Attisani M, Ribezzo M, et al. Incidence and severity of primary graft dysfunction after lung transplantation using rejected grafts reconditioned with ex vivo lung perfusion. *Eur J Cardiothorac Surg* (2014) 46(5):789–93. doi: 10.1093/ejcts/ezu239
25. Slama A, Schillab L, Barta M, Benedek A, Mitterbauer A, Hoetzenecker K, et al. Standard donor lung procurement with normothermic ex vivo lung perfusion: a prospective randomized clinical trial. *J Heart Lung Transplant* (2017) 36(7):744–53. doi: 10.1016/j.healun.2017.02.011
26. Cypel M, Rubacha M, Yeung J, Hirayama S, Torbicki K, Madonik M, et al. Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am J Transplant* (2009) 9(10):2262–9. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02775.x
27. Iske J, Hinze CA, Salman J, Haverich A, Tullius SG, Ius F. The potential of ex vivo lung perfusion on improving organ quality and ameliorating ischemia reperfusion injury. *Am J Transplant* (2021) 21(12):3831–9. doi: 10.1111/ajt.16784
28. Katira BH. Ventilator-induced lung injury: classic and novel concepts. *Respir Care* (2019) 64(6):629–37. doi: 10.4187/respcare.07055
29. Sage AT, Richard-Greenblatt M, Zhong K, Bai XH, Snow MB, Babits M, et al. Prediction of donor related lung injury in clinical lung transplantation using a validated ex vivo lung perfusion inflammation score. *J Heart Lung Transplant* (2021) 40(7):687–95. doi: 10.1016/j.healun.2021.03.002
30. Aboelnazar NS, Himmatt S, Hatami S, White CW, Burhani MS, Dromparis P, et al. Negative pressure ventilation decreases inflammation and lung edema during normothermic ex-vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* (2018) 37(4):520–30. doi: 10.1016/j.healun.2017.09.007
31. Lin H, Chen M, Tian F, Tikkanen J, Ding L, Andrew Cheung HY, et al. Alpha-1-Anti-Trypsin improves function of porcine donor lungs during ex-vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant* (2018) 37(5):656–66. doi: 10.1016/j.healun.2017.09.019
32. Francioli C, Wang X, Parapanov R, Abdelnour E, Lugin J, Gronchi F, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate administered during ex-vivo lung perfusion promotes rehabilitation of injured donor rat lungs obtained after prolonged warm ischemia. *PLoS One* (2017) 12(3):e0173916. doi: 10.1371/journal.pone.0173916
33. Nakajima D, Watanabe Y, Ohsumi A, Pipkin M, Chen M, Mordant P, et al. Mesenchymal stromal cell therapy during ex vivo lung perfusion ameliorates ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* (2019) 38(11):1214–23. doi: 10.1016/j.healun.2019.07.006
34. Giraud S, Steichen C, Allain G, Couturier P, Labourdette D, Lamarre S, et al. Dynamic transcriptomic analysis of ischemic injury in a porcine pre-clinical model mimicking donors deceased after circulatory death. *Sci Rep* (2018) 8(1):5986. doi: 10.1038/s41598-018-24282-6
35. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, et al. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med* (2011) 364(15):1431–40. doi: 10.1056/NEJMoa1014597
36. Madisson E, Wilbrey-Clark A, Miragaia RJ, Saeb-Parsy K, Mahbubani KT, Georgakopoulos N, et al. ScRNA-seq assessment of the human lung, spleen, and esophagus tissue stability after cold preservation. *Genome Biol* (2019) 21(1):1. doi: 10.1186/s13059-019-1906-x
37. Wolock SL, Lopez R, Klein AM. Scrublet: computational identification of cell doublets in single-cell transcriptomic data. *Cell Syst* (2019) 8(4):281–91.e9. doi: 10.1016/j.cels.2018.11.005
38. Spinelli L, Carpentier S, Montanana Sanchis F, Dalod M, Vu Manh TP. Bubblegum: automatic extraction of phenotype molecular signatures and comprehensive visualization of multiple gene set enrichment analyses. *BMC Genomics* (2015) 16(1):814. doi: 10.1186/s12864-015-2012-4
39. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102(43):15545–50. doi: 10.1073/pnas.0506580102

3.2 MANUSCRIT N°2

Deciphering the initial steps of SARS-CoV2 infection in whole human lungs identifies macrophages as primary targets and reveals subset-specific responses

En cours de soumission à Cell Reports, Novembre 2023

Thien-Phong Vu Manh^{1#*}, Carla Gouin^{2#}, Julien De Wolf^{2,3\$}, Luc Jouneau^{2,4\$}, Claudia Bevilacqua⁵, Meriadeg Le Gouil⁶, Bruno Da Costa², Christophe Chevalier², Matthieu Glorion^{2,3}, Laurent Hannouche^{1,2}, Céline Urien², Jérôme Estephan², Antoine Magnan^{2,6}, Morgan Le Guen^{2,7}, Quentin Marquant^{2,6}, Delphyne Descamps², Isabelle Schwartz-Cornil^{2*}, Marc Dalod¹, Edouard Sage^{2,3}.

Introduction : Les manifestations cliniques au niveau pulmonaire suite à l'infection par le SARS-CoV-2 sont diverses et peuvent parfois aller jusqu'au développement de pneumonies voir de SDRA. Comme présenté dans la partie 1.5.2.6 de l'introduction, le compartiment des monocytes/macrophages est composé de différentes sous-populations qui diffèrent selon leurs ontogénies ainsi que leurs fonctions. Les AMs, issus du foie foetal, sont des cellules résidentes assurant l'homéostasie pulmonaire par diverses fonctions. Les MoMacs, provenant de la moelle osseuse, peuvent avoir une fonction pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire selon le contexte. Au niveau des Mos, il existe 3 différentes sous-populations i) les cMos recrutés aux sites inflammatoires ii) les ncMos, des patrouilleurs contrôlant l'intégrité endothéliale, et iii) les iMos, dont le rôle n'est pas clairement défini. Au cours de l'infection, ce compartiment subit une perturbation massive qui corrèle de manière forte avec la sévérité, indiquant que ces différents types cellulaires, même s'ils ne semblent pas permettre de cycle productif viral, jouent un rôle crucial dans la pathogenèse. Cependant, toutes ces perturbations ont été étudiées dans les cas avancés d'infection. La réponse initiale au SARS-CoV-2 est mal connue car il s'agit d'une fenêtre très courte et difficile à étudier chez l'homme. Or, les interactions initiales entre les cellules et le virus pourraient conditionner la balance entre la réplication virale, les défenses immunitaires protectrices et l'immunopathologie des formes sévères. Chez l'Homme,

plusieurs modèles *in vitro* ont été établis afin de mimer l'interaction initiale entre les cellules pulmonaires et le virus, dont beaucoup sont des explants pulmonaires. Cependant, les résultats obtenus diffèrent d'une étude à l'autre concernant les cellules cibles (voir tableau 1 dans la partie 2.6 de l'introduction). Dans l'ensemble, les systèmes d'études *in vitro* ne permettent pas de respecter l'architecture tissulaire ni les contraintes anatomiques qui dirigent les interactions entre les cellules et le virus.

Méthodes : Nous avons utilisé un modèle novateur de poumons humains entiers maintenus en vie *ex vivo* grâce à la PPEV pendant 10h afin d'étudier les premières étapes de l'infection par le SARS-CoV-2 au niveau pulmonaire. Ces poumons, refusés pour la transplantation, ont été perfusés et ventilés à 37°C et infectés par nébulisation avec différentes souches de SARS-CoV-2 dans le laboratoire de sécurité de niveau 3 de l'UMR VIM : une souche de la lignée initiale Wuhan-like (WL) et deux variants D614G (D614G-a et D614G-b). Les doses virales administrées sur les 3 poumons infectés sont de 1.2×10^8 PFU (WL), 3.3×10^7 PFU (D614G-a) et 1×10^7 PFU (D614G-b). Nous avons validé le modèle par i) la recherche du matériel génétique viral dans différents prélèvements du parenchyme en RT-qPCR, ii) et par la vérification du maintien de l'infectivité virale post-nébulisation. Par ailleurs, nous avons également isolé et purifié par cytométrie en flux des AMs, MoMacs, cMos et ncMos pulmonaires à partir d'exérèses chirurgicale. Ces différentes sous-populations ont été infectées pendant 24h avec les souches WL et D614G-a à MOI 0.1, qui est la dose classiquement utilisée dans la littérature, et MOI 0.001, qui est une extrapolation de la dose utilisée dans le modèle poumon entier. Les réponses cellulaires ont été étudiées par la détection de cytokines dans le surnageant avec la technique Multiplex. De plus, leur viabilité a été analysée par un marquage Sytox et leur production virale par plaque assay.

Résultats : Dans un premier temps, nous avons détecté de l'ARN viral dans différents échantillons pulmonaires prélevés à 30min, 5h et 10h post-nébulisation, sans augmentation en fonction du temps. Cela suggère qu'il n'y a pas eu de transcription ni

de réplication détectable dans notre fenêtre d'étude. Par ailleurs, nous avons vérifié que la nébulisation n'affectait pas les résultats de titrage viral d'un inoculum test. Ces résultats nous ont permis de valider notre modèle en montrant qu'il y a une bonne diffusion virale au sein du poumon et que la nébulisation n'affecte pas l'infectivité virale. Afin d'étudier les interactions virales avec le poumon au niveau cellulaire, nous avons utilisé la technique de scRNA-seq sur les échantillons pulmonaires infectés récupérés après 10h de PPEV. Après avoir procédé à l'identification des différents types cellulaires pulmonaires, nous avons observé que les reads viraux sont associés de manière significative (p -value=0.0142) avec les AMs et les MoMacs tandis qu'aucun read viral n'a été retrouvé associé aux cellules épithéliales. L'analyse du surnageant des cultures infectées des différentes sous-populations cellulaires isolées à partir des biopsies montre que les 4 sous-populations participent à l'inflammation, via la production de cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , CCL4, IL-1RA, IL-18, CCL3, CCL2 et CXCL8. Cependant, les MoMacs sont les principaux producteurs des cytokines TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , CCL4, IL-1RA et IL-18 et les ncMos sont les moins producteurs. De plus, la souche virale WL induit une réponse cellulaire plus importante que le variant D614G de manière dose-dépendante. Enfin, la dose 0.1 induit généralement plus d'effets que la dose 0.001. Toutefois cette faible dose, proche de celle utilisée dans nos poumons entiers, semble suffisante pour activer les macrophages dans de nombreux cas de cultures cellulaires de nos patients.

Conclusion : Le site d'entrée virale dans les voies respiratoires et alvéoles contient principalement des AMs dans la lumière des alvéoles, et des MoMacs localisés sous les cellules épithéliales et également dans le compartiment aérien dans certaines conditions²⁰⁹. Dans des travaux précédents, les deux populations de macrophages, AMs et MoMacs, ont été montrés capables de capture de pathogènes et d'antigènes administrés dans les voies respiratoires^{116,117}, et nous montrons dans ce travail que ces deux populations sont les cibles primaires du SARS-CoV-2 dans le poumon humain. Par ailleurs, nous avons montré que ces populations sont capables de réponse

inflammatoire au virus, les MoMacs étant les plus puissantes. Nous proposons l'hypothèse suivante : la composition relative en sous populations de monocytes/macrophages au site d'infection initiale dans le poumon ainsi que leurs stades de différenciation et d'activation pourraient être des facteurs importants dans la détermination du devenir de l'infection. Ces facteurs sont probablement influencés par les propriétés génétiques, environnementales et l'historique pathologique des patients. Nous proposons que l'intensité de la réponse initiale en cytokines et chimiokines des monocytes/macrophages conduirait le niveau de recrutement et d'activation d'autres leucocytes. Cela créerait ainsi une boucle d'amplification, générant l'alveolite et des dommages tissulaires pulmonaires qui ont été décrits²¹⁰. De plus, la production de certaines cytokines produites lors de cette boucle d'amplification, notamment l'IL-10 et l'IFN- γ , pourrait activer l'expression de ACE2 et de FcR sur les AMs et l'induction du phénotype M1, ce qui a été associé à la sévérité du COVID-19^{51,211-213}. Ainsi, les résultats de ce travail suggèrent que la réponse initiale des monocytes/macrophages du poumon aurait un impact majeur dans l'initiation de l'amplification inflammatoire conduisant à la pathologie. Les partenaires moléculaires impliqués dans les interactions virales avec les monocytes/macrophages, et plus particulièrement les MoMacs, devraient être identifiés afin de développer des stratégies interférantes prophylactiques.

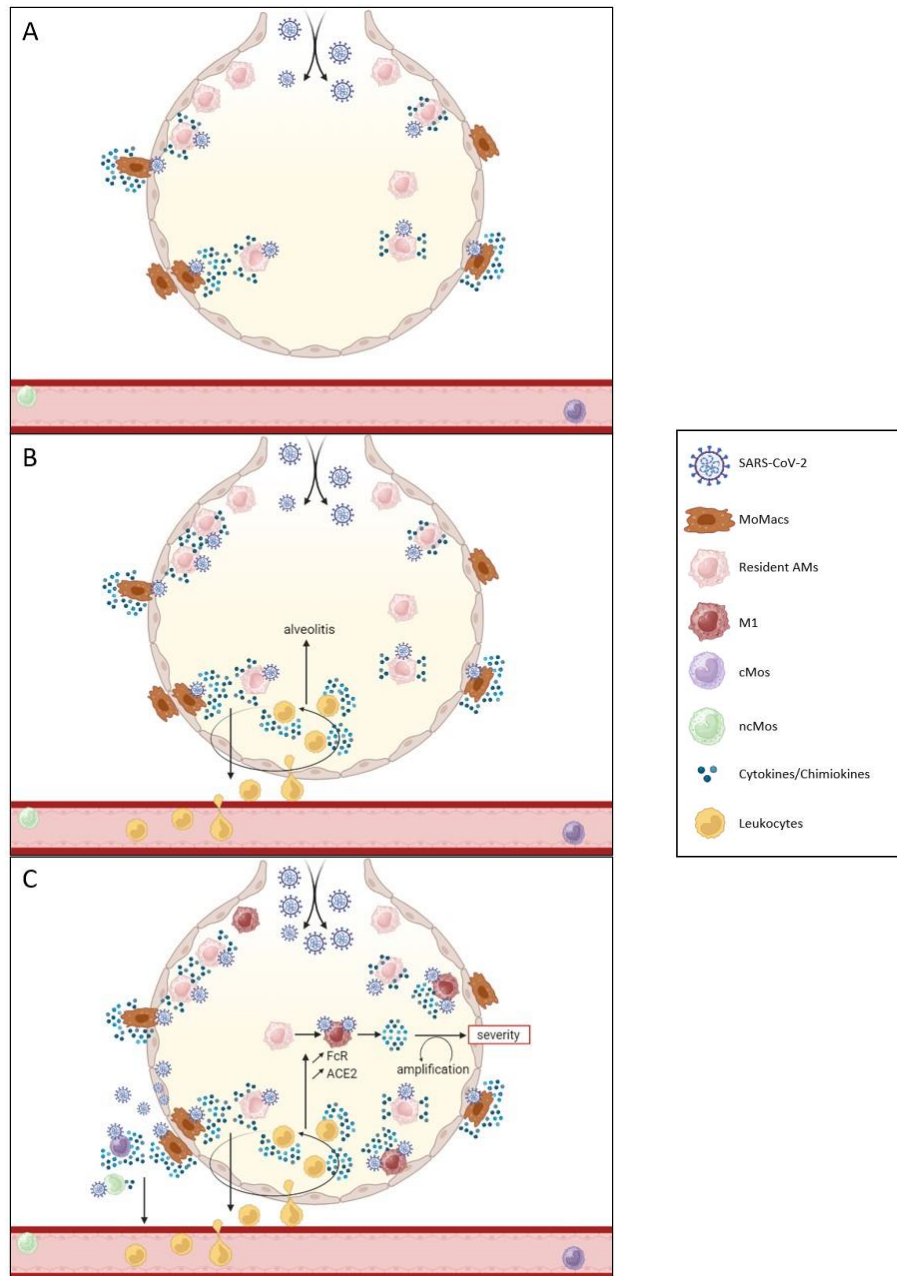


Figure 8. Réponses inflammatoires des macrophages pulmonaires aux temps précoces de l'infection par le SARS-CoV-2 : (A) Les AMs constituent la population dominante dans l'espace alvéolaire. Lorsqu'ils sont exposés au SARS-CoV-2, les AMs et les MoMacs produisent des cytokines inflammatoires (Partie Résultats – 3.2) (B) La production de cytokines inflammatoires active le recrutement de leucocytes sanguins dont des monocytes et lymphocytes T. Ils envahissent l'espace alvéolaire, conduisant ainsi à une boucle d'amplification de l'activation cellulaire locale ce qui favorise le développement de l'alvéolite²¹⁰. (C). Cette réponse inflammatoire (IL-10, IFN- γ) favorise l'activation des AMs qui adoptent un phénotype modifié et/ou pro-inflammatoire M1. Ces macrophages activés sont caractérisés par l'expression de récepteurs ACE2 et FcR, qui sont associés à la sévérité de la maladie²¹¹⁻²¹³. Dans les cas sévères, les ncMos envahissent le poumon où ils peuvent rencontrer le virus¹³⁸. Figure réalisée avec Biorender.

Contribution : Au cours de cette étude sur le modèle de poumon entier, j'ai participé à la collecte des différents échantillons pulmonaires lors de l'infection des poumons dans le laboratoire de sécurité de niveau 3 de l'UMR VIM, jusqu'à la préparation de la banque d'ADN complémentaire (ADNc) avant l'envoi au séquençage. Il s'agissait d'un travail de groupe réunissant des personnes avec des expertises complémentaires : chirurgiens, ingénieur du laboratoire P3, une technicienne, un ingénieur de plateforme de microgénomique, deux chercheurs dont mon encadrante. Cette étude a nécessité d'être disponible 7 jours sur 7 et 24h sur 24 pendant plus d'un an (voir le point 4.4 de la discussion). J'ai ensuite participé aux nombreuses réunions d'analyse des datas scRNA-seq avec l'équipe de Marc Dalod et un ingénieur biostatisticien de l'UMR, comme dans le cas de la partie 3.1 des résultats.

En ce qui concerne le modèle de cellules isolées, je suis allée récupérer les différents échantillons au bloc opératoire. J'ai ensuite procédé à la dissociation tissulaire ainsi qu'au marquage cellulaire. J'ai participé avec mon encadrante au tri des cellules à l'aide du cytomètre trieur que nous possédons au sein de l'équipe, et j'ai acquis une autonomie pour la manipulation du trieur. J'ai ensuite effectué la mise en culture ainsi que l'infection des cellules par le SARS-CoV-2 dans le laboratoire de sécurité de niveau 3 de l'UMR VIM. J'ai procédé à l'analyse des échantillons récoltés en réalisant différentes expériences : détection d'ARN par RT-qPCR, titrages viraux par plaque assay et TCID₅₀, analyse de mortalité cellulaire par un marquage Sytox et analyse cytokinique par Multiplex. J'ai produit et titré certains des lots viraux utilisés. Enfin, j'ai procédé à la présentation des différents résultats sous la forme de figures, que j'ai ensuite structurées pour la soumission de l'article.

Deciphering the initial steps of SARS-CoV2 infection in whole human lungs identifies macrophages as primary targets and reveals subset-specific responses.

Si besoin, je peux fournir les 15 documents additionnels dont la taille de certains n'est pas compatible avec une présentation sous forme de manuscrit de thèse

Thien-Phong Vu Manh^{1#}, Carla Gouin^{2#}, Julien De Wolf^{2,3\$}, Luc Jouneau^{2,4\$}, Claudia Bevilacqua⁵, Meriadeg Le Gouil⁶, Bruno Da Costa², Christophe Chevalier², Matthieu Glorion^{2,3}, Laurent Hannouche^{1,2}, Céline Urien², Jérôme Estephan², Antoine Magnan^{2,6}, Morgan Le Guen^{2,7}, Quentin Marquant^{2,6}, Delphyne Descamps², Isabelle Schwartz-Cornil^{2*}, Marc Dalod¹, Edouard Sage^{2,3}.

1. CNRS, Inserm, Aix Marseille University, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML), Turing Center for Living Systems, 13009, Marseille, France

2. Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France

3. Department of Thoracic Surgery and Lung Transplantation, Foch Hospital, 92150, Suresnes, France

4. Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, BREED, 78350, Jouy-en-Josas, France

5. Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

6. Department of Pulmonology, Foch Hospital, 92150, Suresnes, France

7. Department of Anesthesiology, Foch Hospital, 92150, Suresnes, France

6. CHU Caen

equal contribution 1

\$ equal contribution 2

* corresponding authors

Isabelle.schwartz@inrae.fr

vumanh@ciml.univ-mrs.fr

Key words: SARS-CoV-2, lung, ex vivo models, single cell RNA-seq, monocyte/macrophages, inflammation

Abbreviations: alveolar macrophages (AMs), monocyte-derived macrophages (MoMacs), classical monocytes (cMos), non-classical monocytes (ncMos), conventional type 2 dendritic cells (cDC2), *ex vivo* lung perfusion (EVLV), single cell RNA sequencing (scRNA-seq), cluster (C), differentially expressed genes (DEGs).

Abstract

The initial molecular and cellular steps of SARS-CoV-2 infection that influence the outcome of COVID19 are difficult to decipher because animal models do not always faithfully reproduce human biological processes and *in vitro* models do not recapitulate the histoarchitecture and cellular composition of respiratory tissues. Here we evaluated an original model of *ex vivo* infection of whole human lung with SARS-CoV-2, taking advantage of a technique used in lung transplantation based on organ perfusion and ventilation at normothermia for 10 h. Using single cell RNA-seq, we identified that viral RNA was primarily associated with alveolar and monocyte-derived macrophages (AMs and MoMacs). Exposure to SARS-CoV2 variants of isolated lung AMs, MoMacs, classical monocytes and non-classical monocytes (ncMos) revealed that while all subsets were responsive, MoMacs produced higher inflammatory cytokine levels than AMs, and ncMos were the lowest contributors. A Wuhan lineage appeared more potent than a D614G virus, in a dose-dependent manner. In a context of inconsistent information regarding the initial cell targets of SARS-CoV-2 in the literature, our results clarify that two macrophage subsets, i.e. AMs and MoMacs, are the primary targets of SARS-CoV-2 in a whole human lung and suggest that the extent and nature of their responses may conduct subsequent injury, depending on their respective representation, the viral strain and dose. Interfering on virus interaction with lung macrophages should be considered in prophylactic strategies.

Introduction

The SARS-CoV-2 virus is responsible for a large variety of clinical manifestations affecting the respiratory tract, going from a- or pauci-symptomatic state, to a pneumonia and an acute respiratory distress syndrome. In order to develop effective intervention strategies, several independent studies profiled the precise cell types targeted by the virus, from blood and broncho-alveolar lavages (BAL) at different stages of advanced diseases ¹ and from lungs at autopsy ². In the BAL, SARS-CoV-2 was found associated with epithelial cells and macrophages ¹, and in the lung of deceased patients, with mononuclear phagocytic cells and endothelial cells ² as well as with pneumocytes and airway cells ^{3,4}.

The lung monocytes/macrophage compartment that appears targeted by SARS-CoV-2 from these studies is a heterogeneous population of cell types that remain incompletely characterized. In the mouse model and in human, lung macrophages include two main cell types, named alveolar macrophages (AMs) and interstitial macrophages (IMs). The AMs are the guardians of the air-space homeostasis, through their catabolic, immunomodulatory and repair activities and they can self-renew from local progenitors seeded during the fetal life or also differentiate post-natally from monocytes (Mos), see for a recent review ⁵. IMs, that globally correspond to non-AMs macrophages, have been far less studied; in the mouse, they appear to include distinct subtypes that occupy different parenchymal niches, including the bronchial wall underneath epithelial cells ^{6,7}, the vicinity of nerves or blood vessels ⁸ or even the airspace upon stimulation ⁹. In human, IMs were dominantly found in the alveolar septa ¹⁰. Several studies support that IMs derive from blood monocytes ^{7-9,11} and they are regarded as homologs to the so called monocyte-derived macrophages (MoMacs) from skin, heart and gut ^{7,11}; therefore AMs and IMs can be identified based on transcriptomic signatures and cell surface profiling as AMs and MoMacs respectively, a designation that we will use in this paper ^{7,11}. Importantly, both AMs and IMs were shown able to capture incoming pathogens from the lumen, showing similar degree of phagocytosis in the case of Escherichia Coli and zymosan particles ⁷. The human lung also contains Mos in the airspace and in the vascular compartment even after extensive lavage ¹². Human Mos include 3 different subsets, i.e. the classical CD14^{pos}CD16^{low} monocytes recruited to inflammatory sites, the non-classical CD14^{low}CD16^{pos} also called patrolling monocytes that control endothelial integrity, and the intermediate CD14^{pos}CD16^{pos} monocytes of yet unclear roles ^{13,14}. During SARS-CoV-2 infection, these different monocyte/macrophage cell types (AMs, IMs alias MoMacs, cMos and ncMos) are massively perturbed, to extents that strongly correlate with disease severity ¹⁵⁻²⁰. However these perturbations were only studied in advanced disease. The initial response of the different lung monocyte/macrophage subsets has not been investigated comparatively.

The initial interaction of respiratory tract cells with pathogens may condition the balance between viral replication, effective innate host defense, or development of uncontrolled inflammatory amplification. Indeed in SARS-CoV-2 physiopathology, the initial innate response can promote the expression of Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) and Fc receptors on macrophages as well as induce an inflammatory M1 phenotype, all features being associated with subsequent disease severity ²¹⁻²⁴. Several *in vitro* models have been established to mimic the initial interaction between lung cell types and SARS-CoV2, essentially with explant-based techniques that generated different types of results: some reported that only epithelial cells were infected ²⁵⁻²⁷, others that both epithelial cells and macrophages were equally infected ^{28,29}, and finally that mainly alveolar macrophages were associated to the virus ³⁰. These contrasted results could be due to biases in the various tissue-culture conditions. Furthermore all these systems do not respect the spatial tissue architecture and the anatomic constraints that drive cell type interaction with viruses.

In this study, we used a whole human lung maintained alive *ex vivo* for 10 h, based on a technique used in lung transplantation (*ex vivo* lung perfusion or EVLP), to analyze the first steps of SARS-CoV-2 infection in the lung. Human lungs declined for transplantation were perfused and ventilated at 37°C and infected by SARS-CoV-2 using nebulization of Wuhan lineage and D614G variants. The virus was found associated dominantly with AMs and MoMacs, and not detectably with epithelial cells. Then we exposed to SARS-COV-2, AMs, MoMacs, cMos and ncMos that were freshly isolated from human lungs, and we compared side-by-side their inflammatory responses. In a context of unclear knowledge regarding the initial cell targets of SARS-CoV-2 in the lung, these findings obtained with human lung clarify that AMs and MoMacs are primary SARS-COV-2 targets and reveal that both produce cytokines and chemokines upon viral exposure, with MoMacs being the strongest type.

Material and methods

Cell line

Vero cells (E6 lineage, African Green monkey kidney epithelial cells) were obtained from the American Type Culture Collection (referred as VERO C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6], CRL-1586). Vero E6 cells were cultured in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM, Eurobio Scientific) supplemented with 5 % fetal calf serum (FCS, Eurobio Scientific), 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin at 37°C.

Study design

The EVLP part of the study (Fig. 1A) was approved by the Agence de la Biomédecine and by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation under the number 2020-007, as well as by the ethic committee of the Foch Hospital (IRB00012437). The five donor lungs used in this study were from donation after brain death and were determined to be unsuitable for transplantation (Additional file 1-Anamnesis). Donor lung retrieval was carried out according to current clinical practice using Perfadex (Vitrolife, Göteborg, Sweden) flush preservation. After transportation at 4°C, lungs were processed to EVLP that was conducted according to the Toronto protocol for 10 h³¹ in the BSL3 facilities of the Molecular Virology and Immunology laboratory in Jouy en Josas in the case of the SARS-CoV-2 infection in EVLP, and at the Foch Hospital, Suresnes, in the case of the control EVLP. For SARS-CoV-2 infection in EVLP (3 donor lungs, donors 1, 2, 3), the right lung was connected to the circuit that was filled with the 1 L of Steen solution supplemented with 500 mg methylprednisolone, 750 mg cefuroxime, and 3750 UI heparin. A flow rate at 16% of the theoretical cardiac output was applied at normothermia. The lung was ventilated with a standard ICU-type ventilator equipped with a connected nebulizer with vibrating meshes (Aerogen®), for the delivery of SARS-CoV-2 (see Viruses section). The Steen perfusate (100 ml) was replaced with fresh one every 2 h. The left lung was placed at 4°C and used for sampling before EVLP, designated as 0 h (see sampling section). For control EVLP experiments (2 donor lungs, donors 4 and 5), the whole lung was connected to the circuit that was filled with the 1.5 L of Steen solution supplemented with 1 g methylprednisolone, 1.5 mg cefuroxime, and 7500 UI heparin. A flow rate at 40% of the theoretical cardiac output was applied at normothermia. The Steen perfusate (200 ml) was replaced with fresh one every 2 h. Views of the general experimental set up are shown in Additional file 2-Experimental setup. This part of the study has been conducted in between September 2020 till May 2021. Donors 1, 2, 3 were negative for SARS-CoV-2 virus, not vaccinated and without history of SARS-CoV-2 infection. The lungs from donors 4 and 5 were included in a previous study of our group³².

The lung isolated monocyte/macrophage part of the study (Fig. 1B) was declared as a dossier of "Conservation et de préparation à des fins scientifiques D'Eléments du Corps Humain": (CODECOH) DC N° DC-2020-3981(1). Experiments on human tissues were approved by the regional investigational review board (Comité de Protection des Personnes Île de France VIII, Boulogne-Billancourt, France). Lung tissue samples were obtained from seven patients undergoing surgical resection for lung carcinoma at the Foch Hospital in Suresnes (France) (Additional file 1-Anamnesis). In line with the French legislation on clinical research and as approved by the investigational review board, all the patients gave their informed consent for the use of resected lung tissue for research.

Viruses

The SARS-CoV-2 BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain (passage 2 on Vero E6 cells), clade 19A, was obtained from the Pasteur Institute Paris, and has been isolated from a patient back from Hubei (China) at the Bichat hospital. The whole sequence is available under the

accession number EPI_ISL_410720 (GISAID ID) and belongs to the original Wuhan lineage³³, that will be designated as WL (for Wuhan Lineage) in this paper. For the nebulization of donor 1's lung (Fig. 1A), the virus stock (passage 4) was produced by amplifications in Vero E6 cells at an initial multiplicity of infection of 0.03 for 3-4 days at 33° C in DMEM, centrifuged at 4000g for 10 min 4°C, aliquoted and stored at -80 °C before titration (titer 2×10^7 PFU/ml). For infection of monocyte/macrophages with WL (Fig. 1B), a second WL virus stock was similarly produced (titer 10^6 PFU/ml). The SARS-CoV-2 viral strains UCN1 and UCN15 were isolated in March 2020, during the course of the active epidemic, from nasopharyngeal flocked swabs obtained at the University Hospital of Caen, Normandy, France as described in³⁴. The viral sequences of UCN1 and UCN15 are available at XXXX. The spike nucleotide sequences of UCN1 and UCN15 strains as well as the WL sequence are provided in Additional file 3-sequence and show D614G mutations in both UCN1 and UCN15 strains. UCN1 and UCN15 will be designated as D614G-a and D614G-b in the rest of the paper. For the nebulization of D614G-a in donor 2, a passage 1 was used (titer 5.5×10^5 PFU/ml) and for infection of monocyte/macrophages, a passage 2 was used (titer 10^6 PFU/ml). D614G-b was only used for nebulization (donor 3) and was produced by polyethylene glycol concentration of a passage 2 production (titer 10^8 PFU/ml), following a published protocol³⁵.

Viral titration

For determination of tissue culture infective dose 50 (TCID₅₀)/ml, Vero E6 cells (2×10^4 /well in 96-well plates) were inoculated with tenfold serial dilutions of viral suspension, cultured at 33°C under 5% CO₂ and after 96 h, the cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde and stained with 0.2% crystal violet. The cytopathic effect was evaluated and the viral titers were expressed as 50% tissue culture infective dose per ml (TCID₅₀/ml). For determination of particle forming units (PFU)/ml in a plaque assay, Vero E6 cells (3×10^5 /well in 12-well plates) were inoculated with tenfold serial dilutions of viral supernatants for 1 h, overlaid with 1.2% cellulose microcrystalline (Avicel, FMC BioPolymer) in Minimum Essential Medium Eagle + 2% FCS, cultured at 33°C under 5% CO₂ for 5 days. Following fixation and crystal violet staining, the number of plaques were counted, and the numbers of PFUs/ml were calculated by taking into account the dilution factor.

Nebulization

Viral nebulization was done using a nebulizer with vibrating meshes, see the study design section. The SARS-CoV-2 preparations were adjusted to 6.5 ml in DMEM and the total PFU amounts delivered were 1.2×10^8 PFUs for WL (donor 1), 3.3×10^7 PFUs for D614G-a (donor 2) and 10^7 PFUs for D614G-b (donor 3) that were nebulized in the lungs for about 20 min. The potential effect of nebulization on viral infectivity was evaluated as follows: 10^6 PFUs of WL were diluted in 6.5 ml DMEM and used for a control nebulization delivered to a 50 ml tube instead of to a lung. Three viral suspension samples were harvested before and after 30 min nebulization for viral detection using viral titration (TCID₅₀) and RT-qPCR.

Sampling during the EVLP part

Lung biopsies (2 g each) were taken from similar lung zones from the upper lobes (wedges) before EVLP (0 h), and after 10 h EVLP, cut in 4 pieces, placed in 10 ml HypoThermosol® (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) and kept on ice for 10 to max 24 h. This process was shown to maintain lung tissue stability up to 72 h for scRNA-seq³⁶. In addition 3 small biopsies (100 mg each) were placed in RNAlater at 0 h, 30 min, 5 h and 10 h after the end of nebulization, for RNA extractions. Perfusion liquid was collected every hour during EVLP and stored at -80°C

Lung cell isolation

For the EVLP part of the study, the lung tissue from biopsies kept in HypoThermosol was minced finely with scissors, placed in Multi Tissue Dissociation Kit 1 solution as recommended by the manufacturer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and incubated at 37°C for 45 min in gentle agitation. The minced preparation was crushed on nylon mesh (1 mm) and filtered through successive nylon filters (500 µm, 100 µm, 40 µm). The cell suspension (referred as total cells) was washed in PBS (470 g, 15 min), processed to erythrocyte lysis, resuspended in RPMI + 2 % FCS, filtered twice on 40 µm and counted by 3 independent measurements with a counting chamber. For donors 2 and 3 both at 0 h and 10 h, MHC class 2 positive cells (referred as MHC class 2^{pos}) were enriched using the anti-human HLA-DR bead kit from Miltenyi Biotec (ref 130-046-101) and MS separation columns (ref 130-042-201), following the manufacturer recommendations. Briefly, 10x10⁶ purified lung cells were incubated with 20 µl beads + 80 µl PBS-EDTA-BSA buffer for 15min, filtered on 40 µm, and loaded on MS column for positive selection. The total cells and HLA-DR-positively-selected cells were counted using a counting chamber and checked for viability using trypan blue, and showed over 90% viability.

For the isolated monocyte/macrophage part of the study, lung tissue was obtained from lobectomy at distance from tumors with the minimal possible duration of ischemia in the operating room. The lung tissue was immediately processed in the laboratory. Six grammes of lung were minced and incubated for 45 minutes at 37°C on a rotary shaker in RPMI 1640 supplemented with 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 10% FCS containing 3 mg/ml collagenase D, 0.25 mg/ml Dnase I (Sigma-Aldrich) and 0.7 mg/ml dispase II (Gibco®, ThermoFisher Scientific, St Aubin, France). The minced preparation was crushed and filtered on a nylon mesh (1 mm diameter) and filtered through successive cell strainers (500 µm, 100 µm, 40 µm). Red blood cells were lysed with erythrocytes lysis buffer. After a wash in PBS, about 10⁸ cells (all instances over 90% viability) were kept in 10% FCS overnight at 4°C before being used for staining, analysis or sorting.

Monocyte/macrophage cell sorting and culture with SARS-CoV-2

Isolated human lung cells were stained with fluorescently labelled mAbs following a 15 min incubation at 4°C with Fc block (1:4 ratio, Miltenyi Biotec). We used a mAb combination that was previously documented to identify lung monocytes and macrophage subsets³⁷. The mAbs were diluted in RPMI containing 5% horse serum and 1% HEPES to a final dilution or concentration recommended by the manufacturers: anti-human CD45-FITC (clone HI30, 1/20), anti-murine CD11b-APC/Cy7 (clone M1/70, 5 µg/ml), anti-human CD206-APC (clone 19.2, 1/5), anti-human CD14-PE (clone TUK4, 5 µg/ml), anti-human CD16-Alexa700 (clone 3G8, 5 µg/ml), anti-human CD163-PerCp/Cy5.5 (clone GHI/61, 1/20), anti-human CD169-BV605 (clone 7-239, 1/20), anti-human CD43-PerCp/Cy5.5 (1G10, 1/20, BD Bioscience). For each mAb, a labelled isotype-matched control was used and the specificity of the labeling was controlled using the fluorescence minus one method. Dead cells were excluded by DAPI staining. The cell staining results were analyzed using FlowJo 10.8.1 software. The cell subsets were sorted from an initial amount of 50-120x10⁶ cells using the “purity 1-2” mode of the CytoFLEX SRT sorter (Beckman Coulter). After centrifugation, the sorted cells were resuspended in X-VIVO 15 serum free medium (Lonza), 100 U/ml penicillin and 1 µg/ml streptomycin and 5 x 10⁴ cells were plated per well in a 96-well plate. Cells were incubated at 33°C, 5% CO₂, with WL and D614G SARS-CoV-2 viruses at 0.1 and 0.001 MOIs, in duplicates, for 24 h (and for 48 h for viral detection). MOI 0.1 corresponds to a classical dose used in the literature, and MOI 0.001 corresponds to an estimate of the viral exposure per cell used in the EVLP part of the study (about 10⁸ PFUs for 10¹¹ cells in the human lung³⁸). In parallel the virus inoculum was checked for infectivity on Vero E6 cells. Before and at the end of the incubation,

the cells were observed on a ZOE™ fluorescent imager (BIO-RAD). The culture supernatants were collected at 2 h, and 24 h (48 h in some cases) and stored at -80°C.

Cytokine detection

The cell culture supernatants of monocyte/macrophage culture were assessed for detection of CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8, CXCL10, TNF α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-10, IL-18 and IFN α were assessed with a Human ProcartaPlex™ Mix&Match 12-plex (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA) using a MagPix instrument (Luminex, Austin, TX) and the data were analyzed with the Bio-Plex Manager software (Bio-Rad, Hercules, CA). The detection limit for each cytokine was established from the lowest consistent calculated data by the BioPlex Manager software.

Cell death analysis

After collecting the culture supernatant, the monocyte/macrophage cultures were incubated at 33°C for 15 min with 200 μ l of 2 μ g/ml Sytox Green Nucleic Acid Stain (Invitrogen) diluted in HBSS. Images of wells incubated with Sytox or control solution were captured with a ZOE fluorescent imager and analyzed with the Image J software for determining the percentage of dead cells that stain with Sytox.

Viral detection using RT-qPCR

SARS-CoV-2 RNA was detected using RT-qPCR from lung tissue or putatively infected suspensions (perfusion and nebulization liquids). Lung biopsies in RNAlater (100 mg) were placed in Trizol, homogenized with 1.4 mm ceramic beads in a Precellys 24 bead grinder homogenizer (Bertin Technologies), and purified using the NucleoSpin RNA kit that includes a DNase digestion step (Macherey-Nagel, ref 740955.250). In the case of infected solutions, viral RNA was extracted from 100 μ L using the NucleoSpin® RNA Virus kit from Nagel-Macherey kit (ref 740956.250). The RT-qPCR for the E gene detection was done on 500 ng RNA from lung tissue in 25 μ l final reaction volume and on 2 μ l eluate of viral RNA from solutions in 10 μ l final reaction volume, using the Superscript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR from In vitrogen (ref 11732-088) with forward primer E_Sarbeco-F1 ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT, reverse primer E_Sarbeco-R2 ATATTGCAGCAGTACGCACACA and fluorescent probe E_Sarbeco-P1 FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-Tamra (Sigma-Aldrich, Merck)³⁹. In the case of viral RNA detection from lung tissue, a SARS-CoV-2 RNA calibration curve of a previously titrated WL virus preparation was made with 10-fold dilutions from 2000 to 0.2 PFU per reaction and PFU equivalent per 100 mg were calculated. Negative controls included control lung tissue RNA and H₂O. In the case of viral RNA detection from suspension, a SARS-CoV-2 RNA calibration curve of a previously titrated WL virus preparation was made with 10-fold dilutions from 500 to 0.05 TCID₅₀ equivalent per reaction and TCID₅₀ equivalent per ml were calculated. Negative controls included elution from the RNA extraction performed on control solutions and H₂O. The cycling involved the following steps: reverse transcription at 55 °C for 20 min, denaturation at 95 °C for 3 min, amplification 50 cycles at 95 °C for 15 s and 58 °C for 30 s. A Cq value of 40 was attributed in cases of absence of detection (NA from the machine). The reactions were carried out in a CFX Connect™ light cycler (BIO-RAD).

scRNA-seq and preprocessing of sequencing data

Single-cell suspensions were generated from 14 samples of the EVLP part of the study Additional file 4-filtrationResults. For each sample, 2 x 10⁴ cells were loaded onto the 10x Chromium to produce sequencing libraries, which were processed according to methods provided by 10x Genomics (v3 Chemistry). Cell cDNA was sequenced using the Truseq

Illumina Stranded protocol and the Illumina NextSeq 550 sequencing machine ($> 3 \times 10^8$ reads/sample). The reads were aligned with Cell Ranger v3.1.0 on the human genome using the GRCh38 assembly and the GTF file downloaded from Ensembl release 101. The 14 samples' sequencing results were pre-processed and normalized using Seurat v4.3.0. Cells expressing less than 1000 genes were removed. Dead or lysed cells were excluded by removing cells with a percentage of mitochondrial genes above a threshold calculated using the Scater package (median percentage of mitochondrial genes across all individual cells + 3 median absolute deviations). Filtration of the data also included the removal of doublets using Scrublet (<https://github.com/AllonKleinLab/scrublet>⁴⁰, expected doublet rate set to 0.08), see Additional file 4- filtrationResults for the results of the filtering procedure. The scRNA-seq raw data of donors 4 and 5 were included in a previous study of our group³², however they were reprocessed together with the other data sets for the clustering strategies and definition of cell identities in the subsequent steps.

Clustering strategies

We followed a similar workflow as the one used in our previous work³². In order to correct for the donor and time effect, we integrated the 14 scRNA-seq samples (Additional file 4. filtration-results) using the FindIntegrationAnchors and IntegrateData functions in Seurat and we produced an "initial integrated UMAP" with 86253 cells (Additional file 5. Azimuth). Parameters of the dimensionality reduction and graph-based clustering were adjusted ($k.param = 12$, $resolution = 0.6$) to obtain 22 clusters. Note that the anchor integration procedure was used only for integration of the 14 samples and assignment of cells to clusters. The whole dataset (86253 cells) was sub-setted in sub-objects per donor (5 sub-objects, donor 1 to 5). All downstream analyses use the expression values normalized for each donor separately, in order to avoid using the data transformed upon integration.

Definition of cell identities in the scRNA-seq data sets

The original cell x gene matrix of each donor were pre-processed and normalized separately as described above and cells were assigned the cluster number of the "initial integrated UMAP". Each donor data set was then analyzed with Azimuth, an automated reference-based algorithm for single-cell annotation (<https://azimuth.hubmapconsortium.org/>, version 2.0.0), using the Human Lung Cell Atlas as a core consensus reference model which encompasses 584,884 human cells of the lung and nose. The finest level of annotation was used. Cells presenting Azimuth annotation scores below 0.6 were discarded. We proceeded to a grouping of "close cell subtypes" in the cases of the B cells (B cells, plasma cells), stromal cells (smooth muscle, adventitial, peribronchial and alveolar fibroblasts), alveolar macrophages (alveolar macrophages, alveolar macrophage CCL3+, alveolar macrophage MT-positive, alveolar macrophage proliferating), blood endothelial cells (arterial, aerocyte capillary, general capillary, venous systemic, venous pulmonary), and lymphatic endothelial cells (lymphatic, differentiating, lymphatic mature, lymphatic proliferating). The cells were associated to both a cluster number and a cell identity. In order to generate robust downstream analyses related to SARS-CoV-2 exposure, the cell identities representing less than 10% per clusters of donors 1, 2 and 3 (EVLP with virus) and cells belonging to an identity/cluster not shared between donors 1, 2 and 3, were discarded for the subsequent analyses (Additional file 5-Azimuth). The cells selected with this Azimuth annotation-based process (66737 cells) were projected onto the "integrated UMAP-filtered", illustrated in Fig. 1A. The contribution of each donor to the "integrated UMAP-filtered" is shown in Additional file 6-Representation donor. The Azimuth-based cell identities (17 in total) that were kept for downstream analyses are: AMs, MoMacs, cMos, ncMos, DC2, mast cells, stromal cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, NK cells, B cells, blood endothelial cells, AT1s, AT2s, Transitional Club/AT2s, Club (non-nasal), Ciliated (non-nasal). As several Azimuth-based identities were found in several clusters, we considered the final identities on the basis of Azimuth identity and cluster belonging, leading to 28 identities.

The representation of the 28 identities in each donor and timing is provided Additional file 7. identities. The top markers of the 28 analyzed cell identities found in the “integrated UMAP-filtered” were extracted separately for each donor, using the normalized expression values of each dataset before integration (top marker genes per cell identity versus the other identities (minimal $\log_2FC \geq 0.25$, Bonferroni adjusted $p\text{-value} \leq 0.05$)). The five lists were then merged into a single list to keep only common markers to all donors, ranked in a decreasing order using the lowest gene expression between the donors (Additional file 8. top expressed markers).

Statistics

The cytokine data were analyzed with the R Studio (v2023.03.1+446) and were \log_{10} transformed. A Shapiro test was used to evaluate the normality of the data distribution in each group and timing. When the data did not pass the normality test, a non-parametric paired Wilcoxon test was used to compare the data between 2 groups. Alternatively a paired t-test was used upon equal variance evaluation. The statistics of the genomic data are reported in the dedicated paragraph. The Fisher’s exact test was used to calculate the probability of finding viral reads in alveolar macrophages (AMs) and/or monocyte-derived macrophages (MoMacs) among the cells from infected lungs.

Results

Establishment of the human lung *ex vivo* perfusion technique to study SARS-CoV-2 initial exposure in whole lung.

In order to study the initial steps of SARS-CoV-2 infection in the human lung by taking into account the micro and macro-anatomic architecture and cell context, we evaluated the feasibility of exploiting a technique used in lung transplantation, i.e. the *ex vivo* lung perfusion (EVLP) that maintains the whole organ alive and leads to fully satisfactory outcome results after lung transplantation⁴¹. As oedema may occur beyond 10 h of *ex vivo* perfusion and thus may compromise the lung quality, we used a 10 h duration of EVLP in the study (Fig. 1A).

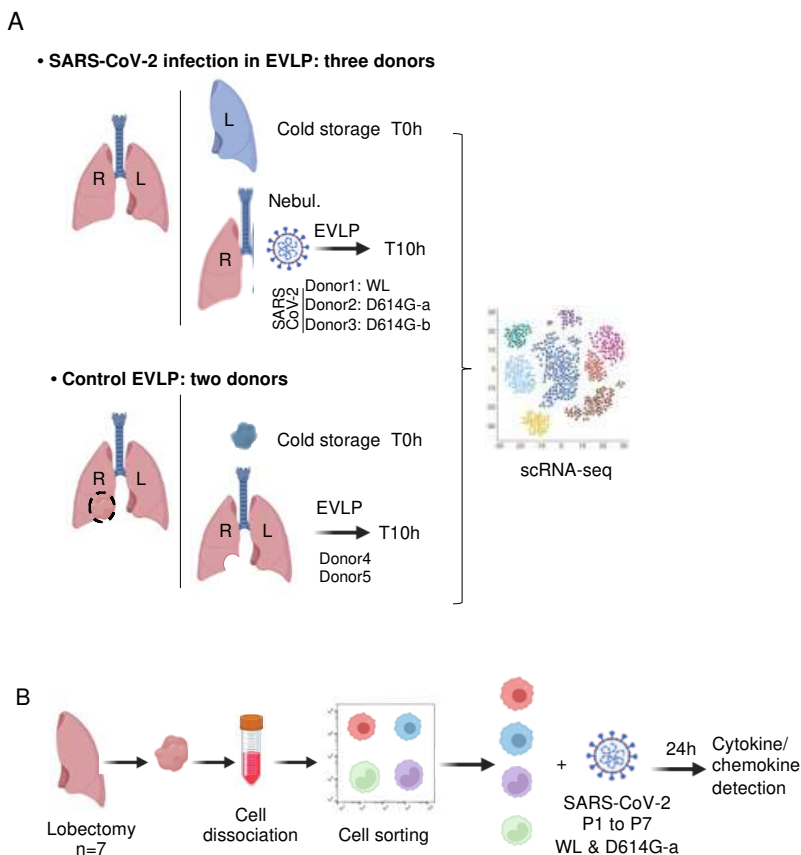


Figure 1. Experimental scheme. A. The EVLP part of the study (see Methods). Three right lungs (Additional file 1-Anamnesis), processed to EVLP for 10 h, were infected with SARS-CoV-2 using a nebulizer at the onset of EVLP. Three different viruses were used: WL for donor 1 (1.2×10^8 PFUs), D614G-a for donor 2 (3.3×10^7 PFUs), D614G-b for donor 3 (10^7 PFUs). A lung biopsy from the left lung was taken at 0 h and placed in hypothermosol at 4°C. Another lung biopsy was taken at 10 h. Two control lungs were processed to EVLP for 10 h and the sampling was performed similarly. Lung cells were isolated from the EVLP biopsies collected at 0 h and 10 h and subjected to scRNA-seq. In the case of donor 2 and 3, additional samples with HLA-DR-enriched cells were subjected to scRNA-seq. B. The isolated lung monocyte/macrophage part of the study (see Methods). Lung tissue samples were obtained from seven patients undergoing surgical resection for lung carcinoma (Additional file 1-Anamnesis). Lung cells were isolated, labelled with mAbs for monocyte/macrophage identification, and sorted with a CytoFlex sorter. The 4 purified subsets (alveolar macrophages, monocyte-derived macrophages, classical monocytes and non-classical monocytes) were exposed to SARS-CoV-2 WL or D614G virus at 0.1 and 0.001 MOI for 24 h and the supernatants were assayed for cytokine detection using a human ProcartaPlex™ Mix&Match 11-plex. Created with Biorender.com.

Three human lungs declined for transplantation (Additional file 1 Anamnesis) were processed to EVLP as described in the Methods and at the onset of EVLP, each lung was infected with SARS-CoV-2 using a nebulizer (Additional file 2. Experimental setup). The 3 donor lungs received a different viral preparation, i.e. a Wuhan lineage (WL) and two D614G isolates (D614G-a and D614G-b) that had been minimally passaged *in vitro* (passage 4, 1 and 2 respectively) for limiting viral drift as much as possible (Additional file 3. viral sequence). The 3 lungs received the maximal available doses in our conditions, i.e. 1.2×10^8 for WL (donor 1), 3.3×10^7 for D614G-a (donor 2), and 10^7 for D614G-b (donor 3, see discussion). In addition, 2 other lungs were used as control EVLPs as reported in³² (donor 4, 5). The 5 lungs used in the study all presented good macroscopical quality and respiratory function during the whole duration of EVLP (PaO₂/FiO₂ > 400 mm Hg). It should be noted that good quality lungs

declined for transplantation are rare material for research, what explains the limited number of lungs in the study. SARS-CoV-2 RNA was detected by qRT-PCR in different samples of the lung wedges at 30 min, 5 and 10 h post nebulization, indicating a good dispersion of the inoculum (Fig. 2A). However the level of viral RNA did not increase between 30 min and 10 h. In addition we checked that the nebulization preserved viral infectivity: indeed no significant difference in plaque assay results was found between the viral suspension tested before and after nebulization (Fig. 2B). Finally viral RNA could not be detected in the perfusion liquid even after 10 h, indicating that the inoculum did not cross the alveolo-capillary barrier (Fig. 2C). Altogether exposure to SARS-CoV-2 of whole human lung can be achieved using the EVLP system during 10 h with stable maintenance of lung respiratory function.

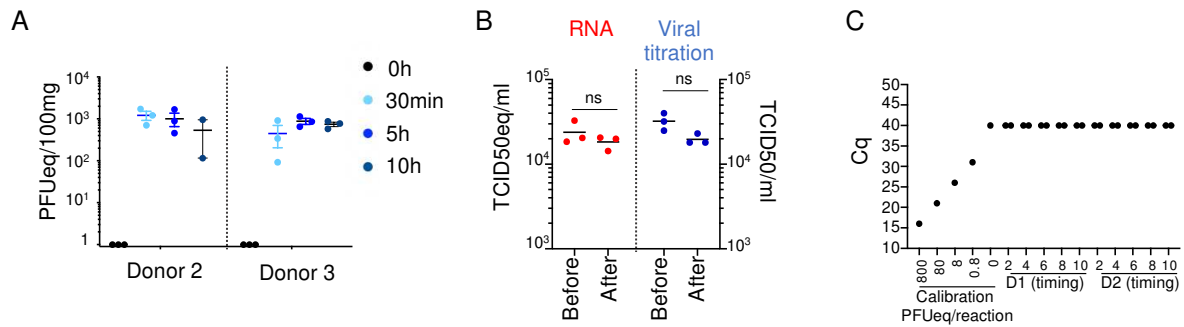


Figure 2: Analysis of SARS-CoV2 viral exposure upon infection of whole lung maintained alive and functional by ex vivo perfusion and ventilation. **A.** Detection of SARS-CoV-2 genome in different lung biopsies after nebulization. From donor 2 and 3 lungs, independent lung biopsies (100 mg each, 3 per timing) were collected in RNAlater before nebulization and 30 min, 5 h and 10 h after the end of the nebulization (20 min duration). SARS-CoV-2 E gene was detected in the tissue RNA using RT-qPCR run in parallel to a calibration curve established from a titrated WL viral preparation, and the results were expressed in PFU equivalents (PFUeq) reported to 100 mg of lung tissue. **B.** Control of viral infectious potential upon nebulization. A WL viral preparation (10⁶ PFU) was nebulized in 6.5 ml RPMI for 20 min in a collection tube in place of a lung. Three viral suspension samples were collected before the nebulization (Before) and 30 min after (After) the end of nebulization, viral RNA was extracted, subjected to RT-qPCR detection as described in A except that the results were expressed in TCID50eq/ml. In parallel, three other viral suspension samples (Before and After) were titrated for their infectivity on Vero E6 cells and the results were expressed in TCID50/ml. **C.** Detection of the SARS-CoV-2 genome in the perfusion liquid. Perfusion liquid samples (100 μ l) were collected every two hours during EVLP, viral RNA was extracted and subjected to RT-qPCR as described in A. The Cq values of the calibration curve and of the different samples are shown. No viral RNA could be detected in perfusion liquid (Cq value 40 was attributed to no detection).

scRNA-seq composition of whole human lungs infected ex vivo with SARS-CoV-2 and controls

For studying the interaction of SARS-CoV-2 with lung at the resolution of single cells, we proceeded to scRNA-seq from biopsies of the lungs undergoing EVLP for 10 h after viral exposure (donor 1, 2, 3) and in control conditions (donor 4, 5) (Fig. 1A). As references, lung biopsies from the 0 h time point of the same donor (no EVLP) were included. All biopsies were taken from similar upper lung zones and proceeded to single cell isolation; in addition in donor 2 and 3, we added samples enriched in HLA-DR^{pos} cells at 0 and 10 h (see Additional file 4. filtrationresults for the list of the samples). The scRNA-seq were conducted on 2x10⁴ loaded cells from each sample (14 in total) using the 10X Genomics 3'end RNA-seq V3 chemistry. High-quality transcriptomes from 86,253 cells were generated upon removal of mitochondrial genes and cell doublets (Additional file 4. filtrationresults). In order to identify clusters corresponding to the same cell types across donors and timings, we integrated our 14 samples using a batch correction algorithm, generating an initial "integrated UMAP" with 22 clusters (Additional file 5. Azimuth). In order to determine the cell identity, we applied Azimuth to map our scRNA-seq data onto the Human Lung Cell Atlas (Human lung reference v2). Upon

filtration of the data based on Azimuth scores and exclusion of minor identities (see Additional file 5. Azimuth and Methods), we generated an “integrated UMAP-filtered” (Fig. 3A) with the 22 clusters, and 17 cell identities (66737 cells). All donors are similarly represented in the integrated UMAP-filtered (Additional file 6. Representation). The clusters correspond to C0 alveolar macrophages (AMs), C1 alveolar epithelial type 2 (AT2s), C3 AMs and monocyte-derived macrophage (MoMacs), C4 CD8⁺ T cells, C5 NK cells and CD8⁺ T cells, C6 AMs and AT2s, C7 non-classical monocytes (ncMos) and classical monocytes (cMos), C8 blood and lymph endothelial cells (blood and lymph ECs), C9 CD4⁺ T cells, C10 cMos, C11 MoMacs and type 2 conventional dendritic cells (cDC2), C12 alveolar epithelial type 1 (AT1s), C13 stromal cells, C14 Club and Transitional/Club-AT2 epithelial cells, C15 AMs and ECs, C16 B cells, C17 ciliated epithelial cells, C18 Mast cells, C19 AMs, C20 undefined cells, C21 AT2s. Note that despite the use of Scrublet to remove doublets in the data processing (see Methods), C6 and C15 clusters included distant cell types. As the same identity given by Azimuth is found in different clusters and may correspond to cells in different activation/differentiation states, the final cell identity was defined by association of Azimuth identity and cluster belonging, leading to 28 final identities (Fig. 3B). In most cases, the 28 final identities are populated by cells from all donors at all timings, except in the case of very minor clusters (C19 and C21) and for Club cells in the control donor 5 (see Additional file 7. identities-donor-time)

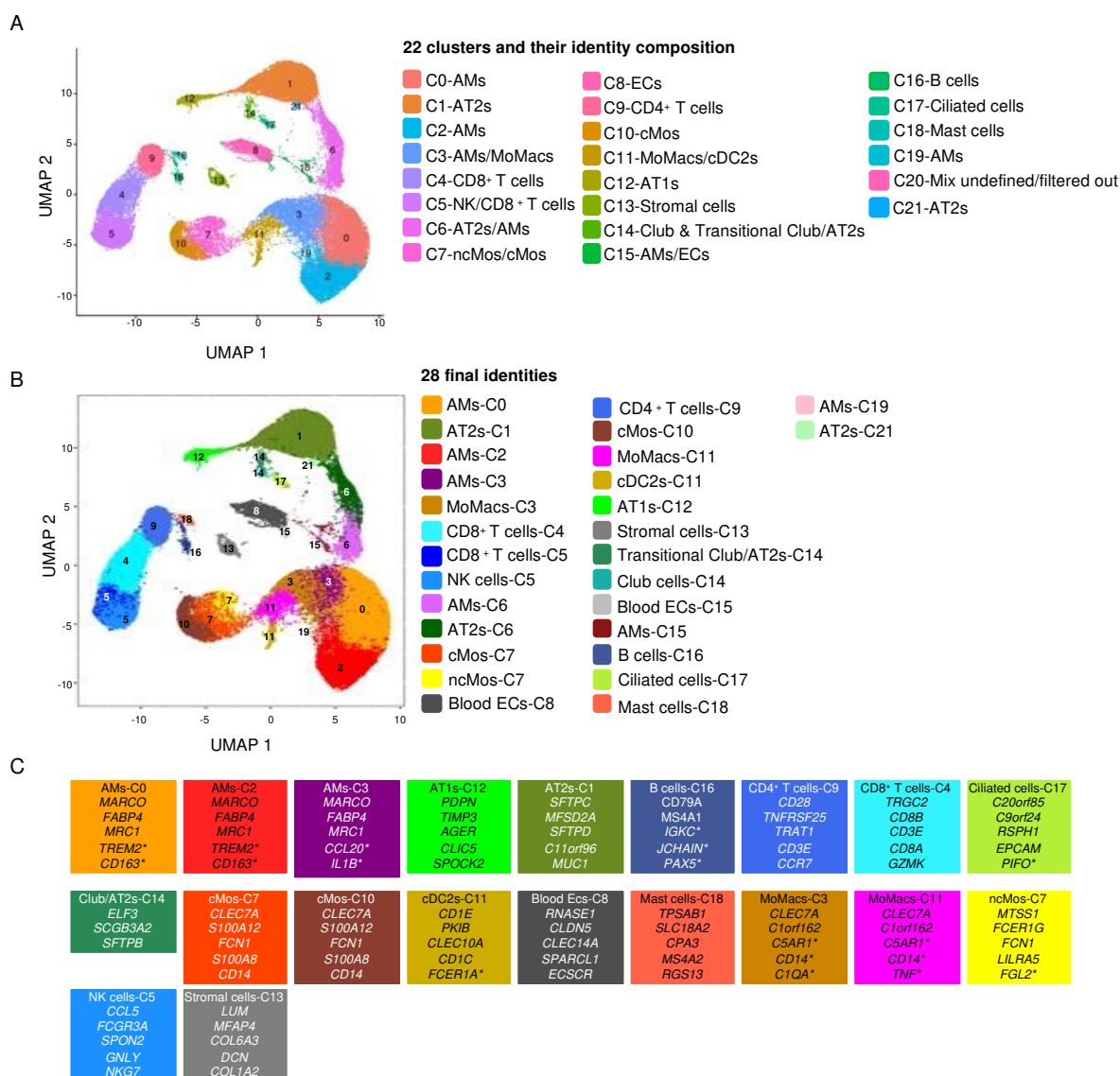


Figure 3. Single cell RNA-seq analysis of lung samples undergoing EVLP upon SARS-CoV-2 nebulization and control conditions, and definition of cell identities. **A.** Cells were isolated from 5 donor lungs subjected to EVLP, at 0 h (no EVLP) and at 10 h EVLP; 3 lungs were nebulized at the onset of EVLP with SARS-CoV-2 (donor 1 with WL, donor 2 with D614G-a, donor 3 with D614G-b) and 2 lung EVLPs were conducted without virus (control EVLP for donors 4 and 5), see Fig. 1, and Methods. Samples from the isolated cells (14 samples total) were used for 10X genomics scRNA-seq and scRNA-seq data of lung samples were processed for high quality transcriptomes, integrated, clustered and submitted to cell annotation analysis with the Azimuth package. A grouping of "close cell subtypes" given by Azimuth was done (see Methods). Cells with low annotation scores (< 0.6), under represented identities ($< 10\%$ per cluster in donor 1, 2 or 3), and identities in clusters not shared between donor 1, 2, 3 were excluded (see additional file 5. Azimuth). The filtered cells were projected onto the "integrated UMAP-filtered" shown in A, with 22 clusters (C0 to C21, shown on the UMAP). For each cluster, the cell identity composition given by Azimuth is indicated. **B.** The final cell identities given by Azimuth and cluster belonging are projected on the UMAP. A total of 28 final identities were obtained. **C.** Top markers expressed by the major final identities. The italic gene names are shared with the canonical markers of the similar identities of two resources papers^{42,43}. Top markers with a * are representative of a cell type or of a cell type function/activation state reported by others: *TREM2* and *CD163*⁴⁴, *CCL20* and *IL1B*¹², *IGKC*, J chain and *PAX5*⁴⁵, *PIFO*⁴⁶, *FCER1A*⁴⁷, *C5AR1*, *CD14*, *C1QA* and *TNF*¹⁴, *GFL2*³².

Finally the top expressed markers of the different final cell identities are provided in Additional file 8- top markers. From these top expressed markers, a selection of hallmark genes of the cell identities is shown on Fig. 3C that was based on commonalities with i) canonical markers defined in two resources papers from lung scRNA-seq^{42,43} and ii) pertinent genes from other papers (see next). In particular AMs are associated with 4 clusters (C0, 2, 3, 6) indicating different activation state, that remain poorly defined as also reported by others¹². The AMs-C6 signature is included in the AMs-C0 signature. C0, C2 and C3 express the AM canonical markers *MARCO*, *FABP4* and *MRC1*^{42,43}. The AMs-C0 and AMs-C2 express the *TREM2* and *CD163* genes that are markers of profibrotic AMs⁴⁴ and AM-C3 express inflammatory cytokine genes such as *CCL20* and *IL1B*, previously found to define a small pro-inflammatory AM subset in the airways of healthy human patients¹². The MoMacs are associated with the C3 and C11 clusters and both share the expression of the canonical MoMac genes *CLEC7A* and *C1orf162*^{42,43} as well as the expression of *C5AR1* and *CD14* that are typical of macrophages derived from monocytes¹⁴. Notably C3 express complement genes such as *C1QA* and *C1QC* whereas C11 express inflammatory cytokine genes such as *TNF*, *CCL3*, *CCL20* (Fig. 3C and Additional file 8. top markers).

In conclusion, the analyzed human lungs in this study include the major cell types and subtypes of epithelial, myeloid, lymphoid, vascular and stromal cells that are expected in human lungs⁴², with several identities such as AMs and MoMacs found in different clusters that appear to correspond to differences in cell activation states.

SARS-CoV-2 RNA is associated with AMs and MoMacs in whole human lung infected ex vivo

The SARS-CoV-2-positive cells were projected onto the "integrated UMAP-filtered" (Fig. 4A). The 23 SARS-CoV-2-positive cells were found associated to AMs (C0, C2, C3, and C6) and MoMacs (C3 and C11), in the case of donor 2 and 3, with more virus-positive cells originating from donor 2 (17 for donor 2, 6 for donor 3). Few virus-positive cells (4) had been removed from the filtration based on Azimuth score, thus corresponding to cells of poorly defined identities that we did not consider. No virus-positive cells were found in the case of donor 1 (WL strain). A statistical analysis with a Fisher's exact test showed that the false discovery rate for SARS-CoV-2 RNA to be associated with AMs or MoMacs among all lung cells was 2.58×10^{-8} , with AMs-only was 4.7×10^{-4} , and with MoMacs-only was 1.3×10^{-2} .

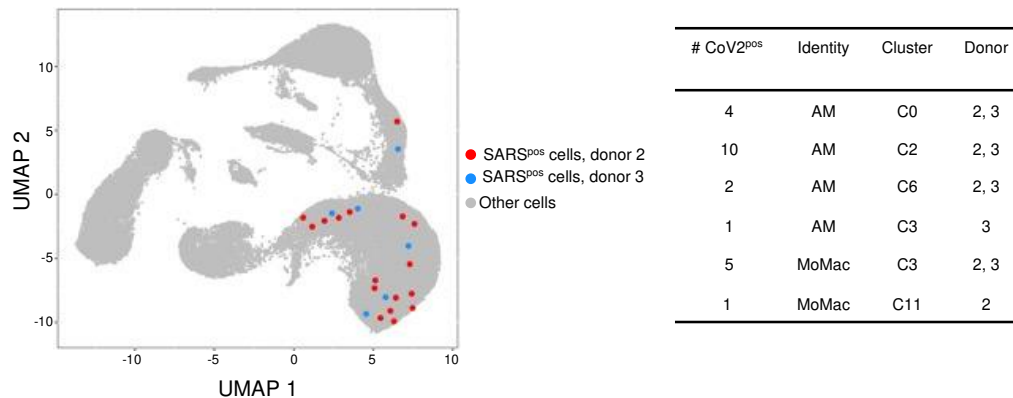


Figure 4. SARS-CoV-2 RNA is dominantly associated with macrophages upon whole lung infection. The SARS-CoV-2-positive cells (23 after filtration) were projected on the UMAP and the association with identities and clusters is shown.

We retrieved the normalized gene expression of SARS-CoV-2 known receptors and sensors across the different lung identities for each donor, i.e. Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 1 (SIGLEC1, CD169), Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-Integrin 1 (DC-SIGN, CD209), Asialoglycoprotein Receptor 1 (ASGPR1), ACE2, Toll-like Receptor (TLR)2 and TLR4, Basigin (BSG, CD147), Fc Gamma Receptor IIIa (FCGR3A), AXL Receptor Tyrosine Kinase (AXL), Neuropilin 1 (NRP1), Transmembrane Serine Protease 2 (TMPRSS2), and Transmembrane Protein 106B (TMEM106B) (Additional file 9. viral receptor). The viral reads were found associated with cell identities (AMs and MoMacs) that globally express relatively higher levels of FCGR3A, BSG (CD147), NRP1, AXL, FCGR3A, BSG and TLR4, as compared to other cell identities (Additional file 9. viral receptor). However at the single cell level, cells with viral reads were not found systematically associated with high mRNA expression of SIGLEC1, FCGR3A, NRP1, AXL, FCGR3A, BSG nor TLR4, within any of the cell type nor across all cell types. Donor 1, for whom no viral read could be detected, expressed similar levels of the putative SARS-CoV-2 receptors across cell identities as donor 2 and 3, therefore a lack of receptor expression at the mRNA level in this donor does not explain lack of binding (Additional file 9. viral receptor).

Overall, SARS-CoV2 virus is found associated to AMs and MoMacs and not to epithelial cells in the context of whole lung infection, indicating a major tropism of this virus for these two myeloid cell types. However the association with AMs and MoMacs at the single cell level was not systematically related to the relative high expression of a given putative receptor, at the mRNA level.

Lung monocytes/macrophage subsets differentially respond to SARS-CoV-2, with MoMacs producing higher inflammatory cytokine levels than AMs

An analysis of the differentially expressed genes between the 3 infected and 2 control lungs after 10 h EVLP did not consistently retrieve enriched biological pathways. Indeed as the EVLP procedure induces in itself substantial biological response in different subsets as we recently published³², no meaningful biological pathway was found enriched between 10 h and 0 h that would be associated to viral infection and not to the EVLP procedure. Several hypotheses can be proposed to explain this failure that will be discussed next. In order to analyze and compared the response of lung AMs and MoMacs to an initial exposure to SARS-CoV-2, we isolated and purified these subsets as well as cMos and ncMos, which are close cell types,

from human lungs upon lobectomy (7 patients). The gating strategy for sorting these subsets has been established based on the one of the Ankit Bharat's group in Chicago³⁷ and Patrick Hume's group at NIH¹⁰ and is reported in Fig. 5A. The expression of monocyte/macrophage markers on the subsets is shown on a representative example: AMs (CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{hi}CD14^{lo}) express higher relative expression of CD169, CD163 and CD43 than the other subsets, MoMacs (CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{hi}CD14^{int}) express higher levels of CD14 and lower CD206 than AMs, cMos (CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{neg}CD14^{pos}) express the highest level of CD14 and low levels of CD16, and ncMos (CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{neg}CD14^{neg}) display the highest levels of CD16. For information, the profile of intermediate Mos (CD45^{pos}CD11b^{pos}CD206^{neg}CD14^{int}CD16^{pos}) is presented; as the Cytotflex srt is a 4-way sorter, we excluded this subset, whose function remains poorly understood. In 7 patients, the proportion of the different sorted subsets among lung live cells laid between 0.6 and 7.1% for AMs ($3.3 \pm 2.2\%$, mean \pm sd), 1.2 and 5.2% for MoMacs ($2.3 \pm 1.4\%$), 1 and 3.9% for cMos ($2.4 \pm 1\%$) and 1.8 and 7.1% for ncMos ($3.2 \pm 1.8\%$), Fig 5B.

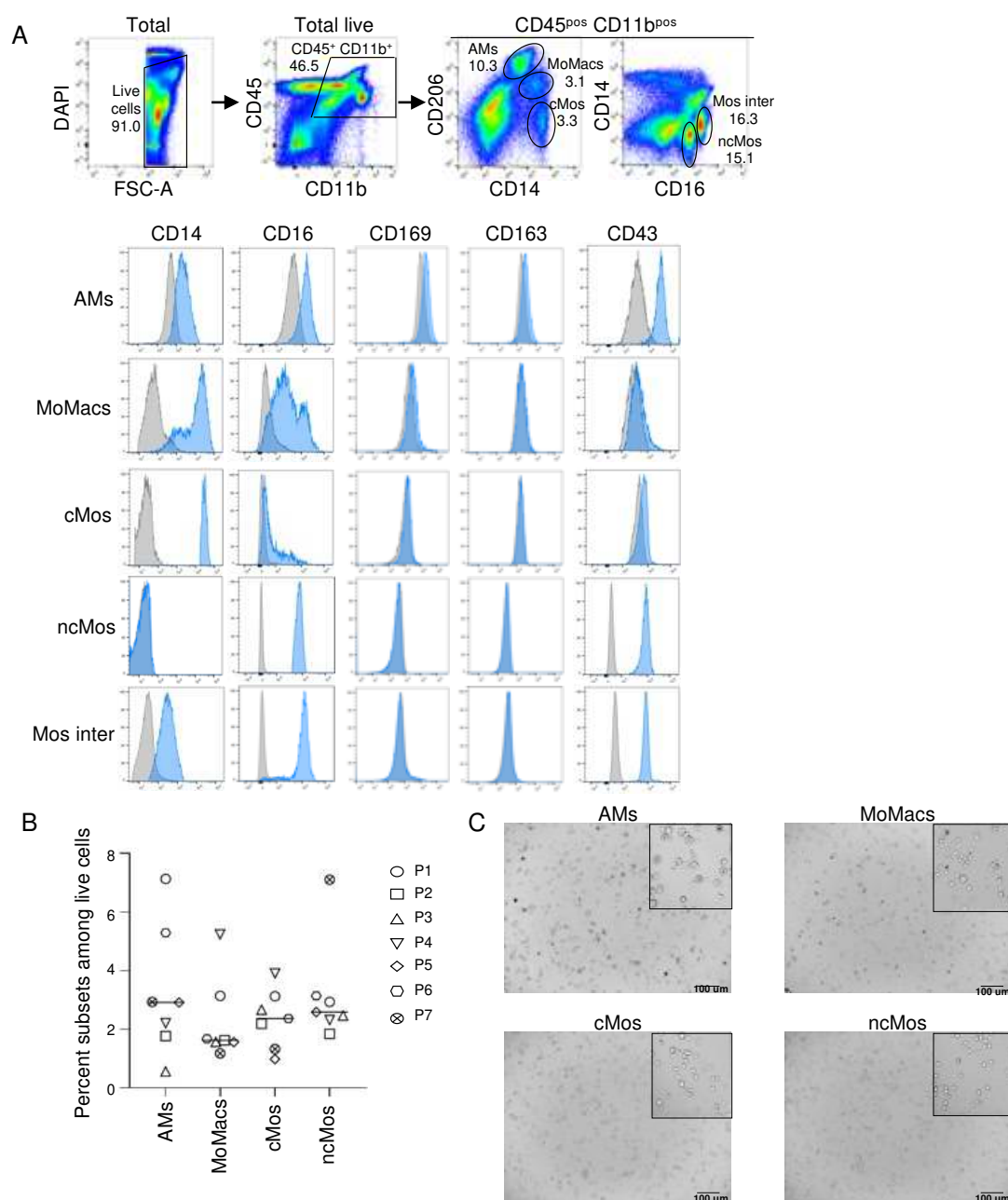


Figure 5. Lung monocyte/macrophage subset characterization and sorting. **A.** Gating strategy and expression of markers on lung monocyte/macrophage subsets (representative patient). Lung cells were isolated from lung biopsy obtained upon lobectomy, and stained with a combination of the following conjugated mAbs: anti-CD45-FITC, anti-CD11b-APC/Cy7, anti-CD206-APC, anti-CD14-PE, anti-CD16-Alexa700, anti-CD163-PerCp/Cy5.5, anti-CD169-BV605, anti-CD43-PerCp/Cy5.5. For each mAb, a labelled isotype-matched control was used and the specificity of the labeling was controlled using the fluorescence minus one method. Dead cells were excluded by DAPI staining. From the live CD45^{pos}CD11b^{pos} cell gate, alveolar macrophages (AMs) were identified as CD206^{hi}CD14^{lo} cells, monocyte-derived macrophages (MoMacs) as CD206^{int}CD14^{hi} cells, classical monocytes (cMos) as CD206^{neg}CD14^{hi} cells, non-classical monocytes (ncMos) as CD16^{pos}CD14^{neg}, and intermediate monocytes (Mos inter) as CD16^{pos}CD14^{pos} cells. The staining intensity of the different subsets for CD14, CD16, CD169, CD163 and CD43 is shown in blue histograms overlaid on their respective isotype control histogram in grey. **B.** The percent of AMs, MoMacs, cMos and ncMos is reported for 7 patients used for cell subset sorting. **C.** Photos of the AMs, MoMacs, cMos and ncMos plated in 96-well plates (x20). Higher magnifications are shown in a highlighted square (x60).

The cells of the 4 different monocyte/macrophage subsets were placed in culture (5×10^5 per 96-well, Fig. 5C) and exposed to SARS-CoV-2 for 24 h. Two of the viral strains nebulized in the whole lung model were used, i.e. WL and D614G-a, at a conventional dose generally found in the literature (0.1 MOI) and at a dose similar to the one used in the nebulized lung (0.001 MOI, see methods). After 24 h, no cell death was induced by the viruses and no production of viral particles could be detected in any of the subset, nor after 48 h (Additional file 10. Mortality+productive). After 24 h, chemokine and cytokine productions were measured in the supernatants using the Luminex/Multiplex technology. IFN α and CXCL10 were not detected and thus not illustrated. We first analyzed the intrinsic response of each subset to WL and D614G-a according to viral dose by calculating the fold change of cytokine/chemokine expression upon viral exposure over mock condition and we compared these fold changes between subsets, viral doses and viral strains (Fig. 6, see Additional files 11 for means \pm sd and Additional files 12 and 13 for detailed p-values). For 3 chemokines, i.e. CXCL8, CCL3 and CCL2, MoMacs presented lower fold changes than AMs and cMos presented lower fold changes than ncMos in most instances (see Fig. 6, Additional file 11 and 12). Conversely for 4 cytokines, i.e. TNF α , IL-6, IL-10 and IL-1 β , a reverse pattern was observed: MoMacs presented higher fold changes than AMs and in most cases cMos presented higher fold changes than ncMos (except in the case of IL-6 with D614G-a). No clear pattern was observed for CCL4, IL-1RA and IL-18. Overall MoMacs and cMos behaved similarly. For all subsets across the analyzed chemokine/cytokines, higher fold changes responses to WL than to D614G-a were obtained (in 80 comparisons throughout conditions, 35 show higher responses to WL than to D614G-a versus only 3 in the reverse orientation, p-values < 0.079, see Additional file 13); only CCL2 and IL-18 did not follow this trend. Finally higher responses were obtained with the 0.1 MOI dose for WL (20 out of 40 comparisons, p-values < 0.059 with only one in the reverse orientation), and less in the case for D614G-a (7 out of 40 comparisons, p-values < 0.067, with 2 in reverse orientation, see Additional file 13).

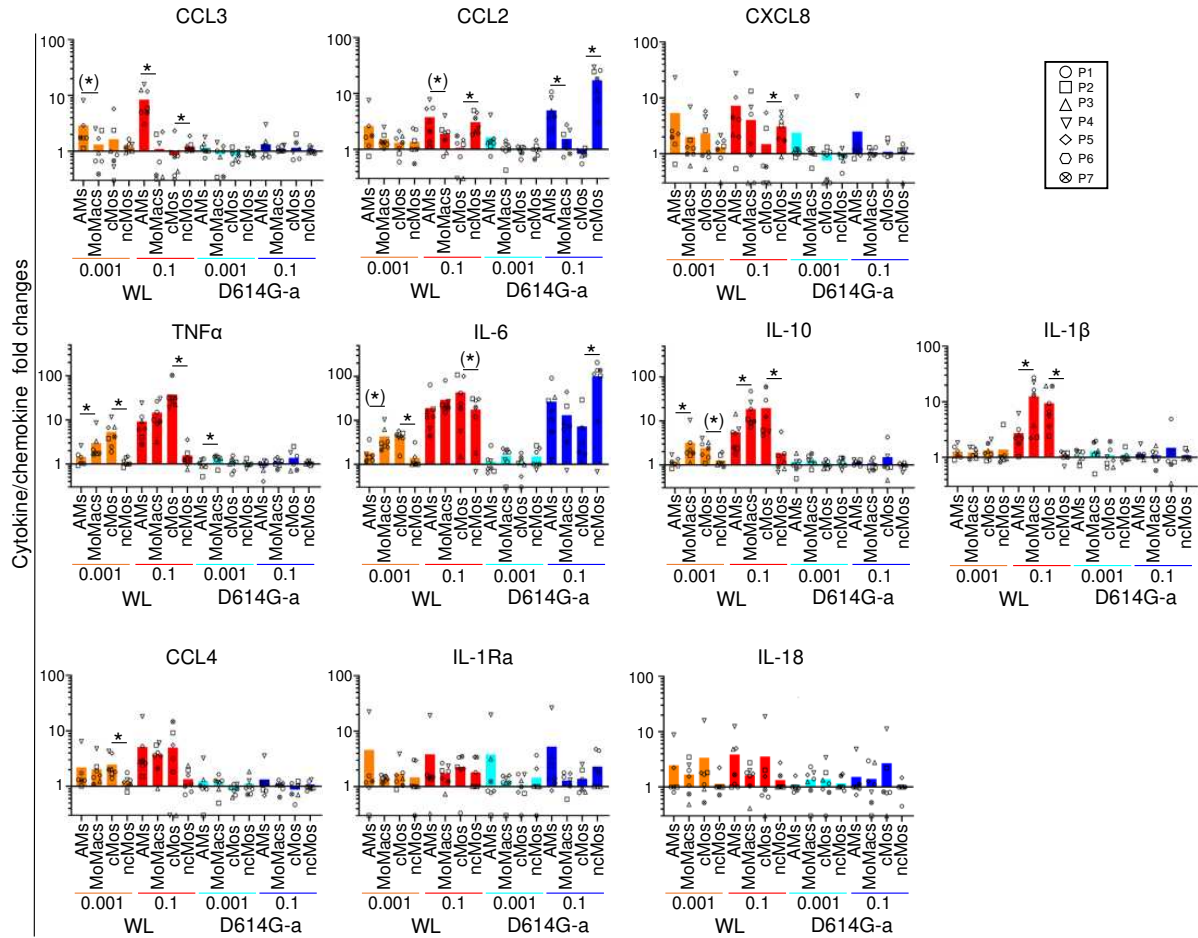


Figure 6. Cytokine/chemokine fold changes induced by SARS-CoV-2 in lung monocyte/macrophages, depending on viral doses, viral strains and cell subsets. The sorted lung AMs, MoMacs, cMos, ncMos (5×10^4 , duplicates) from 7 patients were exposed to SARS-CoV-2 WL and D614G-a at 2 MOI, i.e. 0.1 and 0.001 MOI. The supernatants from mock cultures and viral exposed cultures were collected after 24 h and subjected to cytokine detection using Human ProcartaPlex™ Mix&Match 12-plex. The detection limit for each cytokine was established from the lowest calculated data by the BioPlex Manager software. For the different cytokines/chemokines, for each subset in each condition, a ratio between the stimulated and mock culture was calculated, Additional file 11. Mean+sd-22.08.2023-10.10.2023. The ratios were log transformed and analyzed with the R Studio (v2023.03.1+446). A Shapiro test was used to evaluate the normality of the data distribution in each group and timing. When the data did not pass the normality test, a non-parametric paired Wilcoxon test was used to compare the data between 2 groups. Alternatively a paired t-test was used upon equal variance evaluation. The statistics' results of paired comparisons are reported in Additional file 12. FoldChange-pval-CompSubsets-10.10.2023 and Additional file 13 FoldChange-pval-CompVirus-10.10.2023. The p-values between the AMs and MoMacs and between the Mos and ncMos are reported on the figure, as * when < 0.05 and as (*) when comprised between 0.08 and 0.05. The cytokines result panel were grouped as follows: top lane with several AM values $>$ MoMac values and ncMos values $<$ cMos values, mid lane with AM values $<$ MoMac values and ncMos values $<$ cMos values, bottom lane without clear pattern.

While the expression fold changes between virus-stimulated versus mock conditions informs on the intrinsic response of the different subsets to the virus, the viral effect on the global production of the cytokine in the milieu is better reflected by differences of cytokine levels between stimulated and mock conditions (= net production, Fig. 7, see Additional files 11 for means \pm sd, and Additional files 14 and 15 for detailed p-values). Indeed for instance, as MoMacS produced higher net production of CCL4 and IL-1RA in mock conditions than AMs, the cytokine fold changes are not different between the 2 subsets, however the net production of these cytokines under stimulation of MoMacS is higher than the one of AMs (p-value < 0.072 in several cases). The analysis of net cytokine/chemokine productions shows that for the 3 chemokines CXCL8, CCL3 and CCL2, no clear/consistent differences between AMs and MoMacS nor between ncMos and cMos were found (Fig. 7, Additional files 11 and 14). Conversely, for 7 cytokines/chemokine, i.e. TNF α , IL-6, IL-10, IL-1 β , CCL4, IL-1RA and IL-18, MoMacS presented higher net production values than AMs, MoMacS generally did not much differ from cMos and ncMos presented lower net production values than all other subsets in most instances (Fig. 7, Additional files 11 and 14).

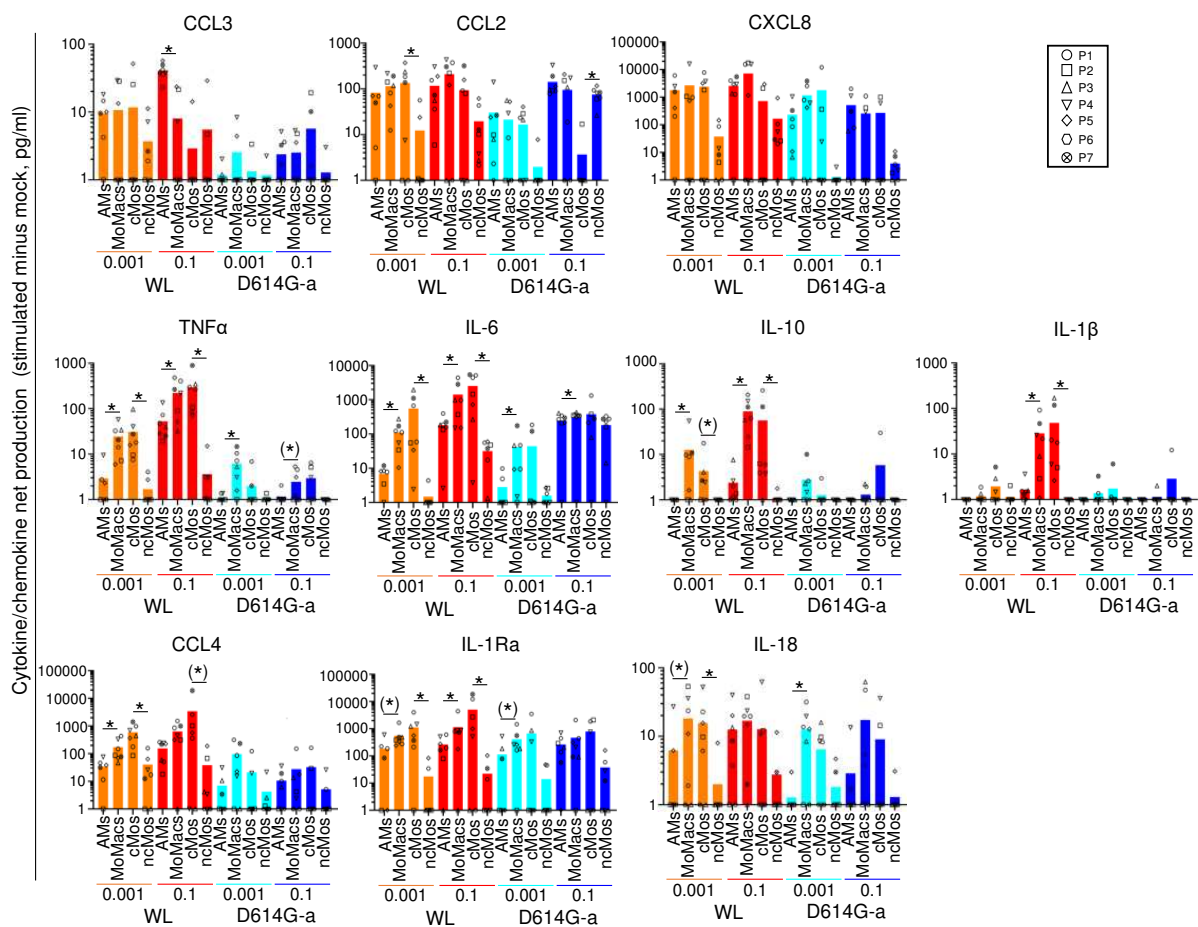


Figure 7. Cytokine/chemokine net production induced by SARS-CoV-2 in lung monocyte/macrophages, depending on viral doses, viral strains and cell subsets. For the different cytokines/chemokines analyzed with the human ProcartaPlex™ Mix&Match 11-plex, for each subset in each condition, the difference of cytokine levels between the stimulated and mock culture was calculated and analyzed as in figure 6, Additional file 11. Mean \pm sd-22.08.2023-10.10.2023. The statistics' results of paired comparisons are reported in Additional file 14. NetProduction-CompSubsets-10.10.2023 and Additional file 15. NetProduction-CompSubsets-10.10.2023. The p-values between the AMs and MoMacS are reported on the figure, as * when < 0.05 and as (*) when comprised between 0.08 and 0.05. The cytokines result panel were grouped as follows: top lane with AM values > or not different to MoMac values, mid and bottom lanes with AM values < MoMac values.

This mode of analysis also shows a higher net production in response to WL than to D614G-a (in 80 comparisons, 35 show higher responses to WL than to D614G-a versus only 2 in the reverse orientation, p-values < 0.073, Additional file 15). Also higher net production responses to viral stimulation were obtained with the 0.1 MOI dose for WL (18 out of 40 comparisons, p-values < 0.062), and less in the case for D614G-a (9 out of 40 comparisons, p-values < 0.075).

Overall all monocyte/macrophage subsets produce inflammatory chemokines and cytokines upon SARS-CoV-2 stimulation, and MoMacs appear as the highest producer among the different lung monocyte/macrophage subsets. The monocyte/macrophages responses depended on the viral strain and dose.

Discussion

Our work provides novel insight into the initial events of SARS-CoV-2 interaction with human lung, the main target organ of the virus-induced pathology, by using original approaches with infection of whole lung and of lung-derived monocyte/macrophage subsets. These approaches have not yet been used for that purpose, to be the best of our knowledge. Our results show that i) AMs and MoMacs are the main targets of SARS-CoV-2 in the first hours of lung infection, ii) both AMs and MoMacs as well as cMos and ncMos produce inflammatory cytokines upon exposure to the virus and iii) MoMacs are the highest producers and ncMos the lowest. These results indicate that both AMs and MoMacs can capture the nebulized virus from the lumen, as found for other antigens and pathogens^{6,7}. MoMacs, that were found most inflammatory upon SARS-CoV-2 exposure on this study, have been found to accumulate in the lung depending on patient history, pathology and genetics^{5,10,48}, and we also found here that their proportion varies between patients (Figure 5). Therefore we propose that the intrinsic extent of response of AMs and MoMacs and the relative representation in MoMacs may direct the amount of chemokine and cytokine synthesis, leading to leukocyte recruitment from blood (NK, monocytes, T-cells), favoring the development of alveolitis and subsequent lung injuries⁴⁹. This early inflammatory response may favor the activation of macrophages adopting a M1 phenotype, with expression of ACE2 and Fc receptors that were found associated with severity²¹⁻²⁴. Our results also indicate that, in addition to the monocyte/macrophage subset representation, the viral dose and viral strain can impact on the magnitude of the inflammatory response by lung macrophages.

The role of monocyte/macrophages in COVID-19 pathogenesis, in particular in inflammatory cytokine production, remains controversial. Indeed several studies show that exposure of monocyte/macrophages to SARS-CoV-2 triggers inflammatory cytokine synthesis like we found⁵⁰⁻⁵⁵, whereas others report that it does not⁵⁶⁻⁶⁰. The reasons for this discrepancy may involve methodological caveats, yet differences in the origin and type of macrophages can play an important role in the obtained response. Most of the cited studies above implicate macrophages differentiated *in vitro* from monocytes, and may not display the same functional properties as monocytes and macrophages imprinted by the lung tissue. Furthermore, the M2 macrophage type (generated with M-CSF) appears unable to respond to SARS-CoV-2, in contrast to the M1 macrophages (generated with GM-CSF)^{57,61,62}, underlying the impact of macrophage state in the response to SARS-CoV-2. Nevertheless, the results by Honske et al with lung explants somehow align with our finding as they detected SARS-CoV-2 RNA mainly in AMs and in MoMacs, and rarely in other cell types³⁰, and the virus induced expansion of inflammatory macrophages with early induction of inflammatory gene expression. However, at the difference with ours, their study involved lung slices, that do not take into account the global respiratory tract anatomy. Here we used a multiplex approach and showed that the cytokine production levels induced by SARS-CoV-2 segregated into two groups, one group with similar levels produced by AMs and MoMacs (CCL2, CCL3, CXCL8), and the other group with higher levels by MoMacs than AMs (CCL4, IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-10, IL-18, TNF α). The panel of cytokine/chemokine response that we tested was limited to 12 cytokines based on previous knowledge⁶³, and we may have missed other selective type of responses by subsets. In any event no IFN α could be detected, confirming the results of others regarding AMs and SARS-CoV-2⁶⁴.

The difference of responses between monocyte/macrophage subsets that we observed, and between studies that use different culture modalities, may pertain to differential expression of receptors, sensors and surface lectins. Several studies underline that some monocyte/macrophages express Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2)^{29,57}, the most documented SARS-CoV-2 receptor, and that this expression conditions the monocyte/macrophage response to the virus. However, expression of ACE2 on

monocyte/macrophage is debated, and was very weak in our scRNA-seq analysis (Additional file 9. Viral receptors-10.10.2023)^{29,30,54,57,60,65}. Others document that SIGLEC1 (CD169) on macrophage restricts the entry of the virus in these cells that express pro-inflammatory cytokine upon sensing via the MAVS-dependent pathway⁵⁵. In addition TLR2 that binds the envelop protein⁶⁶ and NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) that binds ORF8⁶⁷ were shown involved in inflammatory cytokine production in human monocytic cells. Finally capture of apoptotic bodies from infected cells was shown to be a determining mechanism in macrophage response to SARS-CoV-2, a property that also may depend on receptor expression on macrophage types⁵⁸. In the present study, viral association was not systematically found related to high expression, at the single cell level, of any of the putative receptors ACE2, TMPRSS2, CD209, TMEM106B, TLR2, ASGR1, SIGLEC 1, FCGR3A, BSG, NRP1, AXL, and TLR4, across cell types or within a cell type (Additional file 9. Viral receptors-10.10.2023). Of note SIGLEC1 mRNA that stands as a likely candidate for interaction with macrophages, was not particularly well expressed by donor 2 macrophages, that carries most of SARS-CoV-2 reads among the 3 infected lungs. However mRNA may not reflect the level of protein expression. In addition, viral capture by macrophages may involve different possible receptors even within the same cell type.

Viral features (strain, mode of production, dose) may affect conclusions on viral tropism that conflict between studies. In the whole lung infection, we used the maximal dose of our viral productions that could be nebulized (10^7 to 1.2×10^8 PFUs), taking care of limiting the *in vitro* passage and amplification to avoid viral drift (passage 1 to 4). The viral dose received by the lung in patients is not known and it depends on a first replication in the upper respiratory tract⁶⁸. In a study of viral inoculation in human volunteers⁶⁹, the virus expression initially rose in the nose, peaking at $\sim 8.87 \log_{10}$ copies per milliliter. As viral copies reach at least 10 times higher values than PFU/ml, the amount that we administered thus lays in a clinically relevant range. With the limit of the viral dose used, we detected few virus-positive cells in the scRNA-seq, 27 in total and 23 on identified cell types. After infection of ferrets between day 2 and 5, a very low proportion of positive cells (identified as ATs and AMs) was also found in scRNA-seq, even lower than here⁷⁰. The limitation of sensitivity of RNA read detection in the 10X genomics 3' chemistry v3 technique with the sequencing depth that we used (about 100 to 1000 copies RNA per gene per cell⁷¹) may explain in part the low number of positive cells and we may thus have detected only the cell types that are the most strongly associated to virus. In addition, as surfactant protein A alleviates infectivity in epithelial cells⁷², the access to epithelial cell types may have been strongly prevented in the whole lung conditions as it occurs physiologically, what would be less the case in other *ex vivo* techniques such as explants, due to washing out. The viral strain and mode of production may affect the viral tropism. All our viruses were produced on Vero E6 cells, yet no viral read was found associated to lung cells in the case of WL, despite the high dose used (1.2×10^8 PFUs). It is possible that the D614G mutation in the spike, that was shown to be associated to a higher viral infectivity and transmissibility⁷³, may have favored the infectivity in our whole lung model with the D614G-a and -b viruses. In addition biological particularities of donor 1 may have been involved in the lack of viral detection.

We could not detect productive infection in the monocyte/macrophages isolated from donor lungs and exposed *in vitro* to the virus (Additional file 10. mortality+productive); this is the most consensual finding among reports dealing with monocyte/macrophages despite exceptions^{29,74}. Several studies document that SARS-CoV-2 develops an abortive cycle in macrophages, with accumulation of genomic and subgenomic RNA and viral proteins but no production of infectious particles⁵³⁻⁵⁵. The abortive cycle of SARS-CoV-2 in macrophage culture sufficed to trigger inflammatory pathways via different documented sensing pathways^{55,66,67}. Upon viral exposure, we could not find evidences for viral-induction of cell death (Additional file 10. mortality+productive), like reported by some authors²⁹ but at odds with others⁵⁰. However we

obtained substantial spontaneous cell death after 24 h culture (about 40 – 50 %). We cultured the cells in X-vivo 15 medium, a serum-free medium adapted to immune cells, without addition of growth factors. While such a level of cell death is expected upon primary cell isolation, sorting and culture for 24 h, it may have affected the results, yet the level of cell death was similar between all monocyte/macrophage subsets (Additional file 10. mortality+productive). Notably we found that the different monocyte/macrophage responses in inflammatory cytokines were higher upon exposure to WL than to D614G virus, indicating that the response of lung monocyte/macrophage subsets varies depending on viral strains. The pathogenicity of viral strains has decreased since the one of the original Wuhan type⁷⁵, and it might be related to a decreased propensity of the daughter viral strains to activate lung monocyte/macrophages.

Our study with infection of whole human lung, while being attractive due to the preserved spatial relationships between virus and cell types, revealed to present several limitations in the current experimental setting. First the logistics is difficult to operate, because it required i) to select lungs declined for transplantation that were of good qualities to withstand 10 h *ex vivo* perfusion, ii) to mobilize a team of at least 7 persons, including surgeons, virologists and immunologists 24 h /24 h during months, iii) to perform the whole experiment during at least 48 h without interruption up to the cDNA step for obtaining high quality transcriptomic data. For these reasons, only a total of 3 infected and 2 control lungs were successfully processed for the study, yet generating robust quality of scRNA-seq data with over 80,000 cells that were well representative of the expected cell type identities in the lung (Fig. 3)⁴². As discussed above, the viral dose was a limitation, especially because it was administered in a unique dose, whereas in real life, it can be expected that the virus produced in the upper respiratory tract repeatedly reaches the lung. Furthermore, EVLP cannot be reliably prolonged beyond 10 h, as oedema may develop, compromising the functionality of lung areas. Although this duration is compatible with the rapid viral replication in culture⁷⁶, it may not be the case in a whole organ and this duration may thus not be sufficient to see virus-induced cell responses nor replication. Indeed we could not find any increase in viral RNA between 30 min and 10 h post nebulization (Fig. 2). Furthermore, we realized that the EVLP per se induces a significant response of the different cell types during the 10 h procedure, as we recently published³². This spontaneous response to EVLP, likely related to ischemia-reperfusion, possibly interfered on the response to the virus and has not allowed to retrieve consistently modified biological pathways induced by the virus. However this caveat also applies to *ex vivo* cell cultures of lung tissue in general (explants, tissue slices) that unavoidably leads to hypoxia-reoxygenation stress responses, a feature that is usually overlooked. While the whole lung donors were negative for SARS-CoV-2 ongoing infection, not vaccinated and without history of SARS-CoV-2 infection, this is not the case of the patients undergoing lobectomies. Therefore the inflammatory responses of isolated monocyte/macrophage subsets of some of these patients may have been modified by a previous infection that is known to reprogram lung macrophages via epigenetic modifications⁷⁷. Finally the methodologies that we used together with the limitation of the current knowledge on lung macrophages do not take well into account the complexity of the AMs and MoMacs differentiation states, nor their exact localization in the airway, alveola, parenchymal, peri or intra-vascular sites^{5,11,42}. The clustering of the scRNA-seq indicates the presence of AMs and MoMacs in different activation/differentiation states, and the MoMacs in our data sets most probably correspond to IMs from mixed niches (bronchial, alveola, peri-endothelial, peri-nervous bundles etc). Note that very few cells corresponded to peri-endothelial IMs, a murine IM subtype that was taken into account by the Azimuth-based annotation⁸, and that were excluded by our filtration process due to poor representation (Additional file 5).

Altogether our original methodology that aimed at elucidating the molecular and cellular basis of COVID-19 initiation using pertinent lung-related features showed that

monocyte/macrophage subsets are primary targets of the virus, and that they differentially respond to SARS-CoV-2 by inflammatory cytokine production, depending on subsets, virus strain and doses. This finding leads to propose that the initial lung macrophage subset composition and state of activation/differentiation in patients, influenced by genetic properties, environmental and pathological history, may be important factors triggering subsequent amplification steps that will determine the outcome of the infection. Therefore molecular partners involved in the viral interaction with monocyte/macrophages, particularly with MoMacs, should be identified to develop interfering prophylactic strategies.

Acknowledgements

"We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, <https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12>) for providing help and/or computing and/or storage resources".

The strain BetaCoV/France/IDF0372/2020 was supplied by the National Reference Centre for Respiratory Viruses hosted by Institut Pasteur (Paris, France) and headed by Pr. Sylvie van der Werf. The human sample from which strain BetaCoV/France/IDF0372/2020 was isolated has been provided by Dr. X. Lescure and Pr. Y. Yazdanpanah from the Bichat Hospital, Paris, France. The strain BetaCoV/France/IDF0372/2020 was supplied through the European Virus Archive goes Global (Evag) platform, a project that has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 653316. We thank Bertrand Schwartz for his valuable critical review of the first draft.

Authors' contribution

T.P.V.M. conceived, performed and synthesized statistical analyses, visualized the data, and edited parts of the manuscript; C.G. performed experiments and visualized the data; J.D.W., C.B., B.D.C, C.C., M.G., C.U., J.E., M.L.G., Q.M. and D.D. performed experiments, L.J. conceived and performed statistical analyses, M.L.G provided the viruses, L.H. performed statistical analyses, A.M. provided major instrumentation, I.S.C. conceived and managed the project, performed experiments and statistics, acquired funding and wrote the manuscript, M.D. conceived and mentored parts of the study and critically reviewed the manuscript, and E.S. conceived and mentored the study.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

List of Additional files

- Additional file 1. Anamnesis of the ex vivo lung perfusion (EVLP) donors and lobectomy patients.**xlsx**
- Additional file 2. Experimental set up for SARS-CoV-2 infection in EVLP
- Additional file 3. Viral sequences.
- Additional file 4. scRNA-seq samples description and filtration results for cell annotation.
- Additional file 5. Azimuth.
- Additional file 6. Representation of the five donors in the integrated UMAP-filtered.
- Additional file 7. Representation of identities in each donor/time data set.**xlsx**
- Additional file 8. Top markers of cluster-identities.**xlsx**
- Additional file 9. Viral receptors for donor 1, 2, 3.
- Additional file 10. Cell survival and viral production by monocyte/macrophage subsets exposed to SARS-CoV-2.
- Additional file 11. Cytokine and chemokine expression induced by SARS-COV-2 stimulation in the different monocyte/macrophage subsets (AMs, MoMacs, cMos, ncMos), means \pm sd. Tab fold changes, Tab net production.**xlsx**
- Additional file 12. Cytokine and chemokine expression fold changes induced by SARS-COV-2 stimulation. Statistical comparisons between cell subsets.
- Additional file 13. Cytokine and chemokine expression fold changes induced by SARS-COV-2 stimulation. Statistical comparisons between virus conditions (strains and doses).
- Additional file 14. Cytokine and chemokine net production induced by SARS-COV-2 stimulation. Statistical comparisons between cell subsets.
- Additional file 15. Cytokine and chemokine net production induced by SARS-COV-2 stimulation. Statistical comparisons between virus condition (strains and virus doses).

Availability of data and materials

The raw data obtained from the Cell Ranger analysis have been deposited on the Gene Expression Omnibus repository of the NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM6756556> and The raw data from the scRNA-seq (fastq files) cannot be placed on a public repository due to legal issues. Indeed the data were obtained from anonymized donors under the approval of the Agence de la Biomédecine and by the Ministère de l'éducation nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation and raw RNA-seq data may possibly permit identification of donor (DOI 10.15252/embr.201948316), therefore conflicting with the respect of anonymization. No novel original codes were developed in this study. The codes used, which are classically used by analysts of scRNA-seq data, are available from the corresponding authors upon request. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the corresponding authors.

References

1. Bost, P., De Sanctis, F., Cane, S., Ugel, S., Donadello, K., Castellucci, M., Eyal, D., Fiore, A., Anselmi, C., Barouni, R.M., et al. (2021). Deciphering the state of immune silence in fatal COVID-19 patients. *Nat Commun* *12*, 1428. 10.1038/s41467-021-21702-6.
2. Delorey, T.M., Ziegler, C.G.K., Heimberg, G., Normand, R., Yang, Y., Segerstolpe, A., Abbondanza, D., Fleming, S.J., Subramanian, A., Montoro, D.T., et al. (2021). COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature*. 10.1038/s41586-021-03570-8.
3. Bhatnagar, J., Gary, J., Reagan-Steiner, S., Estetter, L.B., Tong, S., Tao, Y., Denison, A.M., Lee, E., DeLeon-Carnes, M., Li, Y., et al. (2021). Evidence of SARS-CoV-2 Replication and Tropism in the Lungs, Airways and Vascular Endothelium of Patients with Fatal COVID-19: An Autopsy Case-Series. *J Infect Dis*. 10.1093/infdis/jiab039.
4. Ren, X., Wen, W., Fan, X., Hou, W., Su, B., Cai, P., Li, J., Liu, Y., Tang, F., Zhang, F., et al. (2021). COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas. *Cell*. 10.1016/j.cell.2021.01.053.
5. Rodriguez-Rodriguez, L., Gillet, L., and Machiels, B. (2023). Shaping of the alveolar landscape by respiratory infections and long-term consequences for lung immunity. *Front Immunol* *14*, 1149015. 10.3389/fimmu.2023.1149015.
6. Tang, X.Z., Kreuk, L.S.M., Cho, C., Metzger, R.J., and Allen, C.D.C. (2022). Bronchus-associated macrophages efficiently capture and present soluble inhaled antigens and are capable of local Th2 cell activation. *Elife* *11*. 10.7554/eLife.63296.
7. Gibbings, S.L., Thomas, S.M., Atif, S.M., McCubbrey, A.L., Desch, A.N., Danhorn, T., Leach, S.M., Bratton, D.L., Henson, P.M., Janssen, W.J., and Jakubzick, C.V. (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am J Respir Cell Mol Biol* *57*, 66-76. 10.1165/rcmb.2016-0361OC.
8. Chakarov, S., Lim, H.Y., Tan, L., Lim, S.Y., See, P., Lum, J., Zhang, X.M., Foo, S., Nakamizo, S., Duan, K., et al. (2019). Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* *363*. 10.1126/science.aau0964.
9. Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirottin, D., Xiao, X., et al. (2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* *46*, 457-473. 10.1016/j.immuni.2017.02.016.
10. Hume, P.S., Gibbings, S.L., Jakubzick, C.V., Tudor, R.M., Curran-Everett, D., Henson, P.M., Smith, B.J., and Janssen, W.J. (2020). Localization of Macrophages in the Human Lung via Design-based Stereology. *Am J Respir Crit Care Med* *201*, 1209-1217. 10.1164/rccm.201911-2105OC.
11. Liegeois, M., Legrand, C., Desmet, C.J., Marichal, T., and Bureau, F. (2018). The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell Immunol* *330*, 91-96. 10.1016/j.cellimm.2018.02.001.
12. Mould, K.J., Moore, C.M., McManus, S.A., McCubbrey, A.L., McClendon, J.D., Griesmer, C.L., Henson, P.M., and Janssen, W.J. (2021). Airspace Macrophages and Monocytes Exist in Transcriptionally Distinct Subsets in Healthy Adults. *Am J Respir Crit Care Med* *203*, 946-956. 10.1164/rccm.202005-1989OC.
13. Guilliams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* *49*, 595-613. 10.1016/j.immuni.2018.10.005.
14. Mulder, K., Patel, A.A., Kong, W.T., Piot, C., Halitzki, E., Dunsmore, G., Khalilnezhad, S., Irac, S.E., Dubuisson, A., Chevrier, M., et al. (2021). Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity*. 10.1016/j.immuni.2021.07.007.

15. Chen, S.T., Park, M.D., Del Valle, D.M., Buckup, M., Tabachnikova, A., Simons, N.W., Mouskas, K., Lee, B., Geanon, D., D'Souza, D., et al. (2022). Shift of lung macrophage composition is associated with COVID-19 disease severity and recovery. *bioRxiv*. 10.1101/2022.01.11.475918.
16. Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., Wang, F., et al. (2020). Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med*. 10.1038/s41591-020-0901-9.
17. Chen, S.T., Park, M.D., Del Valle, D.M., Buckup, M., Tabachnikova, A., Thompson, R.C., Simons, N.W., Mouskas, K., Lee, B., Geanon, D., et al. (2022). A shift in lung macrophage composition is associated with COVID-19 severity and recovery. *Sci Transl Med* 14, eabn5168. 10.1126/scitranslmed.abn5168.
18. Mohamed Khosroshahi, L., and Rezaei, N. (2021). Dysregulation of the immune response in coronavirus disease 2019. *Cell Biol Int* 45, 702-707. 10.1002/cbin.11517.
19. julian.knight@well.ox.ac.uk, C.O.-M.-o.B.A.C.E.a., and Consortium, C.O.-M.-o.B.A. (2022). A blood atlas of COVID-19 defines hallmarks of disease severity and specificity. *Cell* 185, 916-938 e958. 10.1016/j.cell.2022.01.012.
20. Sanchez-Cerrillo, I., Landete, P., Aldave, B., Sanchez-Alonso, S., Sanchez-Azofra, A., Marcos-Jimenez, A., Avalos, E., Alcaraz-Serna, A., de Los Santos, I., Mateu-Albero, T., et al. (2020). Differential Redistribution of Activated Monocyte and Dendritic Cell Subsets to the Lung Associates with Severity of COVID-19. *medRxiv*. 10.1101/2020.05.13.20100925.
21. Mitsui, Y., Suzuki, T., Kuniyoshi, K., Inamo, J., Yamaguchi, K., Komuro, M., Watanabe, J., Edamoto, M., Li, S., Kouno, T., et al. (2023). Expression of the readthrough transcript CiDRE in alveolar macrophages boosts SARS-CoV-2 susceptibility and promotes COVID-19 severity. *Immunity*. 10.1016/j.immuni.2023.06.013.
22. Lv, J., Wang, Z., Qu, Y., Zhu, H., Zhu, Q., Tong, W., Bao, L., Lv, Q., Cong, J., Li, D., et al. (2021). Distinct uptake, amplification, and release of SARS-CoV-2 by M1 and M2 alveolar macrophages. *Cell Discov* 7, 24. 10.1038/s41421-021-00258-1.
23. Olivier, T., Blomet, J., and Desmecht, D. (2023). Central role of lung macrophages in SARS-CoV-2 physiopathology: a cross-model single-cell RNA-seq perspective. *Front Immunol* 14, 1197588. 10.3389/fimmu.2023.1197588.
24. Junqueira, C., Crespo, A., Ranjbar, S., de Lacerda, L.B., Lewandrowski, M., Ingber, J., Parry, B., Ravid, S., Clark, S., Schrimpf, M.R., et al. (2022). Fcγ-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature*. 10.1038/s41586-022-04702-4.
25. Hui, K.P.Y., Cheung, M.C., Perera, R., Ng, K.C., Bui, C.H.T., Ho, J.C.W., Ng, M.M.T., Kuok, D.I.T., Shih, K.C., Tsao, S.W., et al. (2020). Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Respir Med* 8, 687-695. 10.1016/S2213-2600(20)30193-4.
26. Alfi, O., Yakirevitch, A., Wald, O., Wandel, O., Izhar, U., Oiknine-Djian, E., Nevo, Y., Elgavish, S., Dagan, E., Madgar, O., et al. (2021). Human nasal and lung tissues infected ex vivo with SARS-CoV-2 provide insights into differential tissue-specific and virus-specific innate immune responses in the upper and lower respiratory tract. *J Virol*. 10.1128/JVI.00130-21.
27. Grau-Exposito, J., Perea, D., Suppi, M., Massana, N., Vergara, A., Soler, M.J., Trinite, B., Blanco, J., Garcia-Perez, J., Alcami, J., et al. (2022). Evaluation of SARS-CoV-2 entry, inflammation and new therapeutics in human lung tissue cells. *PLoS Pathog* 18, e1010171. 10.1371/journal.ppat.1010171.
28. Chu, H., Chan, J.F., Wang, Y., Yuen, T.T., Chai, Y., Hou, Y., Shuai, H., Yang, D., Hu, B., Huang, X., et al. (2020). Comparative replication and immune activation profiles of

- SARS-CoV-2 and SARS-CoV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis*. 10.1093/cid/ciaa410.
29. Magnen, M., You, R., Rao, A.A., Davis, R.T., Rodriguez, L., Simoneau, C.R., Hysenaj, L., Hu, K.H., Consortium, U.C., Love, C., et al. (2022). Immediate myeloid depot for SARS-CoV-2 in the human lung. *bioRxiv*. 10.1101/2022.04.28.489942.
 30. Honzke, K., Obermayer, B., Mache, C., Fathykova, D., Kessler, M., Dokel, S., Wyler, E., Baumgardt, M., Lova, A., Hoffmann, K., et al. (2022). Human lungs show limited permissiveness for SARS-CoV-2 due to scarce ACE2 levels but virus-induced expansion of inflammatory macrophages. *Eur Respir J*. 10.1183/13993003.02725-2021.
 31. Cypel, M., Yeung, J.C., Liu, M., Anraku, M., Chen, F., Karolak, W., Sato, M., Laratta, J., Azad, S., Madonik, M., et al. (2011). Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med* 364, 1431-1440. 10.1056/NEJMoa1014597.
 32. Gouin, C., Vu Manh, T.P., Jouneau, L., Bevilacqua, C., De Wolf, J., Glorion, M., Hannouche, L., Urien, C., Estephan, J., Roux, A., et al. (2023). Cell type- and time-dependent biological responses in ex vivo perfused lung grafts. *Front Immunol* 14, 1142228. 10.3389/fimmu.2023.1142228.
 33. Desmarests, L., Callens, N., Hoffmann, E., Danneels, A., Lavie, M., Couturier, C., Dubuisson, J., Belouzard, S., and Rouille, Y. (2022). A reporter cell line for the automated quantification of SARS-CoV-2 infection in living cells. *Front Microbiol* 13, 1031204. 10.3389/fmicb.2022.1031204.
 34. Monchatre-Leroy, E., Lesellier, S., Wasniewski, M., Picard-Meyer, E., Richomme, C., Boue, F., Lacote, S., Murri, S., Pulido, C., Vulin, J., et al. (2021). Hamster and ferret experimental infection with intranasal low dose of a single strain of SARS-CoV-2. *J Gen Virol*. 10.1099/jgv.0.001567.
 35. Alexander, M.R., Rootes, C.L., van Vuren, P.J., and Stewart, C.R. (2020). Concentration of infectious SARS-CoV-2 by polyethylene glycol precipitation. *J Virol Methods* 286, 113977. 10.1016/j.jviromet.2020.113977.
 36. Madissoon, E., Wilbrey-Clark, A., Miragaia, R.J., Saeb-Parsy, K., Mahbubani, K.T., Georgakopoulos, N., Harding, P., Polanski, K., Huang, N., Nowicki-Osuch, K., et al. (2019). scRNA-seq assessment of the human lung, spleen, and esophagus tissue stability after cold preservation. *Genome Biol* 21, 1. 10.1186/s13059-019-1906-x.
 37. Bharat, A., Bhorade, S.M., Morales-Nebreda, L., McQuattie-Pimentel, A.C., Soberanes, S., Ridge, K., DeCamp, M.M., Mestan, K.K., Perlman, H., Budinger, G.R., and Misharin, A.V. (2016). Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 54, 147-149. 10.1165/rcmb.2015-0147LE.
 38. Crapo, J.D., Barry, B.E., Gehr, P., Bachofen, M., and Weibel, E.R. (1982). Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 126, 332-337. 10.1164/arrd.1982.126.2.332.
 39. Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K., Bleicker, T., Brunink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25. 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
 40. Wolock, S.L., Lopez, R., and Klein, A.M. (2019). Scrublet: Computational Identification of Cell Doublets in Single-Cell Transcriptomic Data. *Cell Syst* 8, 281-291 e289. 10.1016/j.cels.2018.11.005.
 41. Divithotawela, C., Cypel, M., Martinu, T., Singer, L.G., Binnie, M., Chow, C.W., Chaparro, C., Waddell, T.K., de Perrot, M., Pierre, A., et al. (2019). Long-term Outcomes of Lung Transplant With Ex Vivo Lung Perfusion. *JAMA Surg*. 10.1001/jamasurg.2019.4079.

42. Sikkema, L., Ramirez-Suastegui, C., Strobl, D.C., Gillett, T.E., Zappia, L., Madisson, E., Markov, N.S., Zaragosi, L.E., Ji, Y., Ansari, M., et al. (2023). An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med*. 10.1038/s41591-023-02327-2.
43. Travaglini, K.J., Nabhan, A.N., Penland, L., Sinha, R., Gillich, A., Sit, R.V., Chang, S., Conley, S.D., Mori, Y., Seita, J., et al. (2020). A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature* 587, 619-625. 10.1038/s41586-020-2922-4.
44. Misharin, A.V., Morales-Nebreda, L., Reyfman, P.A., Cuda, C.M., Walter, J.M., McQuattie-Pimentel, A.C., Chen, C.I., Anekalla, K.R., Joshi, N., Williams, K.J.N., et al. (2017). Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med* 214, 2387-2404. 10.1084/jem.20162152.
45. Rolink, A.G., Schaniel, C., Busslinger, M., Nutt, S.L., and Melchers, F. (2000). Fidelity and infidelity in commitment to B-lymphocyte lineage development. *Immunol Rev* 175, 104-111.
46. Deprez, M., Zaragosi, L.E., Truchi, M., Becavin, C., Ruiz Garcia, S., Arguel, M.J., Plaisant, M., Magnone, V., Lebrigand, K., Abelanet, S., et al. (2020). A Single-Cell Atlas of the Human Healthy Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 202, 1636-1645. 10.1164/rccm.201911-2199OC.
47. Vu Manh, T.P., Elhmouzi-Younes, J., Urien, C., Ruscanu, S., Jouneau, L., Bourge, M., Moroldo, M., Foucras, G., Salmon, H., Marty, H., et al. (2015). Defining Mononuclear Phagocyte Subset Homology Across Several Distant Warm-Blooded Vertebrates Through Comparative Transcriptomics. *Front Immunol* 6, 299. 10.3389/fimmu.2015.00299.
48. Krombach, F., Gerlach, J.T., Padovan, C., Burges, A., Behr, J., Beinert, T., and Vogelmeier, C. (1996). Characterization and quantification of alveolar monocyte-like cells in human chronic inflammatory lung disease. *Eur Respir J* 9, 984-991. 10.1183/09031936.96.09050984.
49. Grant, R.A., Morales-Nebreda, L., Markov, N.S., Swaminathan, S., Querrey, M., Guzman, E.R., Abbott, D.A., Donnelly, H.K., Donayre, A., Goldberg, I.A., et al. (2021). Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature*. 10.1038/s41586-020-03148-w.
50. Zheng, J., Wang, Y., Li, K., Meyerholz, D.K., Allamargot, C., and Perlman, S. (2021). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Induced Immune Activation and Death of Monocyte-Derived Human Macrophages and Dendritic Cells. *J Infect Dis* 223, 785-795. 10.1093/infdis/jiaa753.
51. Yang, D., Chu, H., Hou, Y., Chai, Y., Shuai, H., Lee, A.C., Zhang, X., Wang, Y., Hu, B., Huang, X., et al. (2020). Attenuated interferon and pro-inflammatory response in SARS-CoV-2-infected human dendritic cells is associated with viral antagonism of STAT1 phosphorylation. *J Infect Dis*. 10.1093/infdis/jiaa356.
52. Abdelmoaty, M., Yeapuri, P., Machhi, J., Olson, K., Shahjin, F., Zhou, Y., Jingjing, L., Pandey, K., Acharya, A., Byrareddy, S., et al. (2021). Defining the Immune Responses for SARS-CoV-2-Human Macrophage Interactions. *bioRxiv*. 10.1101/2021.07.07.449660.
53. Boumaza, A., Gay, L., Mezouar, S., Bestion, E., Diallo, A.B., Michel, M., Desnues, B., Raoult, D., La Scola, B., Halfon, P., et al. (2021). Monocytes and macrophages, targets of SARS-CoV-2: the clue for Covid-19 immunoparalysis. *J Infect Dis*. 10.1093/infdis/jiab044.
54. Sefik, E., Qu, R., Kaffe, E., Zhao, J., Junqueira, C., Mirza, H., Brewer, R., Han, A., Steach, H., Israelow, B., et al. (2021). Viral replication in human macrophages enhances an inflammatory cascade and interferon driven chronic COVID-19 in humanized mice. *bioRxiv*. 10.1101/2021.09.27.461948.
55. Jalloh, S., Olejnik, J., Berrigan, J., Nisa, A., Suder, E.L., Akiyama, H., Lei, M., Ramaswamy, S., Tyagi, S., Bushkin, Y., et al. (2022). CD169-mediated restrictive

- SARS-CoV-2 infection of macrophages induces pro-inflammatory responses. *PLoS Pathog* 18, e1010479. 10.1371/journal.ppat.1010479.
56. Niles, M.A., Gogesch, P., Kronhart, S., Ortega Iannazzo, S., Kochs, G., Waibler, Z., and Anzaghe, M. (2021). Macrophages and Dendritic Cells Are Not the Major Source of Pro-Inflammatory Cytokines Upon SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol* 12, 647824. 10.3389/fimmu.2021.647824.
 57. Labzin, L.I., Chew, K.Y., Eschke, K., Wang, X., Esposito, T., Stocks, C.J., Rae, J., Patrick, R., Mostafavi, H., Hill, B., et al. (2023). Macrophage ACE2 is necessary for SARS-CoV-2 replication and subsequent cytokine responses that restrict continued virion release. *Sci Signal* 16, eabq1366. 10.1126/scisignal.abq1366.
 58. Garcia-Nicolas, O., Godel, A., Zimmer, G., and Summerfield, A. (2023). Macrophage phagocytosis of SARS-CoV-2-infected cells mediates potent plasmacytoid dendritic cell activation. *Cell Mol Immunol*, 1-15. 10.1038/s41423-023-01039-4.
 59. Zhang, Z., Penn, R., Barclay, W.S., and Giotis, E.S. (2022). Naive Human Macrophages Are Refractory to SARS-CoV-2 Infection and Exhibit a Modest Inflammatory Response Early in Infection. *Viruses* 14. 10.3390/v14020441.
 60. Zankharia, U., Yadav, A., Yi, Y., Hahn, B.H., and Collman, R.G. (2022). Highly restricted SARS-CoV-2 receptor expression and resistance to infection by primary human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol*. 10.1002/JLB.4COVA1121-579RR.
 61. Lian, Q., Zhang, K., Zhang, Z., Duan, F., Guo, L., Luo, W., Mok, B.W., Thakur, A., Ke, X., Motallebnejad, P., et al. (2022). Differential effects of macrophage subtypes on SARS-CoV-2 infection in a human pluripotent stem cell-derived model. *Nat Commun* 13, 2028. 10.1038/s41467-022-29731-5.
 62. Yang, Y., and Xu, F. (2022). Evolving understanding of antibody-dependent enhancement (ADE) of SARS-CoV-2. *Front Immunol* 13, 1008285. 10.3389/fimmu.2022.1008285.
 63. Bain, C.C., Lucas, C.D., and Rossi, A.G. (2022). Pulmonary macrophages and SARS-Cov2 infection. *Int Rev Cell Mol Biol* 367, 1-28. 10.1016/bs.ircmb.2022.01.001.
 64. Dalskov, L., Mohlenberg, M., Thyrted, J., Blay-Cadanet, J., Poulsen, E.T., Folkersen, B.H., Skaarup, S.H., Olagnier, D., Reinert, L., Enghild, J.J., et al. (2020). SARS-CoV-2 evades immune detection in alveolar macrophages. *EMBO Rep* 21, e51252. 10.15252/embr.202051252.
 65. Atmeh, P.A., Gay, L., Levasseur, A., La Scola, B., Olive, D., Mezouar, S., Gorvel, J.P., and Mege, J.L. (2022). Macrophages and gammadelta T cells interplay during SARS-CoV-2 variants infection. *Front Immunol* 13, 1078741. 10.3389/fimmu.2022.1078741.
 66. Zheng, M., Karki, R., Williams, E.P., Yang, D., Fitzpatrick, E., Vogel, P., Jonsson, C.B., and Kanneganti, T.D. (2021). TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol* 22, 829-838. 10.1038/s41590-021-00937-x.
 67. Wu, X., Manske, M.K., Ruan, G.J., Witter, T.L., Nowakowski, K.E., Abeykoon, J.P., Tang, X., Yu, Y., Gwin, K.A., Wu, A., et al. (2023). Secreted ORF8 induces monocytic pro-inflammatory cytokines through NLRP3 pathways in patients with severe COVID-19. *iScience* 26, 106929. 10.1016/j.isci.2023.106929.
 68. Hou, Y.J., Okuda, K., Edwards, C.E., Martinez, D.R., Asakura, T., Dinnon, K.H., 3rd, Kato, T., Lee, R.E., Yount, B.L., Mascenik, T.M., et al. (2020). SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* 182, 429-446 e414. 10.1016/j.cell.2020.05.042.
 69. Killingley, B., Mann, A.J., Kalinova, M., Boyers, A., Goonawardane, N., Zhou, J., Lindsell, K., Hare, S.S., Brown, J., Frise, R., et al. (2022). Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat Med*. 10.1038/s41591-022-01780-9.

70. Lee, J.S., Koh, J.Y., Yi, K., Kim, Y.I., Park, S.J., Kim, E.H., Kim, S.M., Park, S.H., Ju, Y.S., Choi, Y.K., and Park, S.H. (2021). Single-cell transcriptome of bronchoalveolar lavage fluid reveals sequential change of macrophages during SARS-CoV-2 infection in ferrets. *Nat Commun* 12, 4567. 10.1038/s41467-021-24807-0.
71. Svensson, V., Natarajan, K.N., Ly, L.H., Miragaia, R.J., Labalette, C., Macaulay, I.C., Cvejic, A., and Teichmann, S.A. (2017). Power analysis of single-cell RNA-sequencing experiments. *Nat Methods* 14, 381-387. 10.1038/nmeth.4220.
72. Jacob, I.B., Gemmiti, A., Xiong, W., Reynolds, E., Nicholas, B., Thangamani, S., Jia, H., and Wang, G. (2023). Human Surfactant Protein A Alleviates SARS-CoV-2 Infectivity in Human Lung Epithelial Cells. *bioRxiv*. 10.1101/2023.04.03.535215.
73. Ulrich, L., Halwe, N.J., Taddeo, A., Ebert, N., Schon, J., Devisme, C., Trueb, B.S., Hoffmann, B., Wider, M., Fan, X., et al. (2022). Enhanced fitness of SARS-CoV-2 variant of concern Alpha but not Beta. *Nature* 602, 307-313. 10.1038/s41586-021-04342-0.
74. Wang, Z., Zhou, Y., Bao, L., Li, D., Lv, J., Wang, D., Li, S., Tong, W.M., Liu, J., Qin, C., and Huang, B. (2021). Escaping alveolar macrophage endosomal retention explains massive expansion of SARS-CoV-2 delta variant. *Signal Transduct Target Ther* 6, 431. 10.1038/s41392-021-00845-4.
75. Barh, D., Tiwari, S., Rodrigues Gomes, L.G., Ramalho Pinto, C.H., Andrade, B.S., Ahmad, S., Aljabali, A.A.A., Alzahrani, K.J., Banjer, H.J., Hassan, S.S., et al. (2023). SARS-CoV-2 Variants Show a Gradual Declining Pathogenicity and Pro-Inflammatory Cytokine Stimulation, an Increasing Antigenic and Anti-Inflammatory Cytokine Induction, and Rising Structural Protein Instability: A Minimal Number Genome-Based Approach. *Inflammation* 46, 297-312. 10.1007/s10753-022-01734-w.
76. Eymieux, S., Rouille, Y., Terrier, O., Seron, K., Blanchard, E., Rosa-Calatrava, M., Dubuisson, J., Belouzard, S., and Roingard, P. (2021). Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. *Cell Mol Life Sci*. 10.1007/s00018-020-03745-y.
77. Theobald, S.J., Simonis, A., Georgomanolis, T., Kreer, C., Zehner, M., Einfeld, H.S., Albert, M.C., Chhen, J., Motameny, S., Erger, F., et al. (2021). Long-lived macrophage reprogramming drives spike protein-mediated inflammasome activation in COVID-19. *EMBO Mol Med* 13, e14150. 10.15252/emmm.202114150.

3.3 MANUSCRIT N°3

Prolonged dialysis during *ex vivo* lung perfusion promotes inflammatory responses

Soumission prévue en Décembre 2023 à Frontiers Immunology (Research topic Lung Transplantation)

Julien De Wolf^{1,2#}, Carla Gouin^{2#}, Luc Jouneau², Antoine Premachandra², Florentina Pascale², Maxime Huriet², Jérôme Estephan², Matthieu Glorion^{1,2}, Jean-Jacques Leplat³, Giorgia Egidy³, Christophe Richard⁴, Valérie Gélain⁴, Céline Urien², Antoine Roux^{2,5}, Morgan Le Guen^{2,6}, Didier Journois⁷, Isabelle Schwartz^{2*}, Edouard Sage^{1,2*}

Introduction : La PPEV est une technique utilisée en transplantation pulmonaire au cours de laquelle des poumons isolés sont perfusés et ventilés en normothermie pendant plusieurs heures avant la transplantation. Comme exposé dans la partie 1.8 de l'introduction, cette technique permet le reconditionnement de poumons dits marginaux qui recouvrent les critères fonctionnels requis pour la transplantation pulmonaire. En pratique clinique la PPEV dure entre 4 et 6 heures, au-delà un œdème pulmonaire apparaît de manière quasi-systématique. De plus, cette technique est également associée à des réponses inflammatoires, probablement dues à la réponse d'ischémie-reperfusion, dont l'étendue est corrélée avec l'apparition de la DPG chez le receveur. Ces réponses négatives durant la PPEV, en particulier lorsqu'elle est prolongée, peuvent également résulter de la préservation extracorporelle du poumon, qui reste métaboliquement actif et accumule des déchets métaboliques en l'absence d'épuration par les organes compétents. Pour atténuer cette accumulation, le liquide de perfusion est régulièrement remplacé, ce qui a un impact sur l'aspect économique de la procédure. Afin de trouver une solution pour améliorer et prolonger la PPEV, des dialyseurs ont été ajoutés aux machines de PPEV et testés expérimentalement sur des poumons humains et porcins. Dans l'ensemble, des conclusions satisfaisantes ont été publiées, avec le maintien de la composition du liquide de perfusion, et éventuellement une amélioration de la viabilité cellulaire. Dans un travail récent, nous avons également

constaté que les changements transcriptomiques induits par la PPEV (protocole Toronto) dans un modèle porcin étaient similaires lors d'une procédure de 6 h, en comparant différentes techniques de gestion du liquide de perfusion (pas de remplacement du liquide de perfusion, remplacements périodiques du liquide de perfusion, dialyse avec une membrane adulte, dialyse avec une membrane pédiatrique de plus faible porosité et de plus petite surface). Cependant, bien que l'ajout d'un dialyseur au circuit de PPEV semble réalisable, des connaissances biologiques supplémentaires sur l'effet de la dialyse sur des temps prolongés de PPEV sont nécessaires pour mieux comprendre les risques et les avantages potentiels avant une possible mise en œuvre clinique.

Méthode : Afin de comparer la technique Gold Standard (GS), qui consiste au remplacement périodique du liquide de perfusion, à l'ajout d'une membrane de dialyse pédiatrique (DP) sur le circuit de PPEV, neuf poumons porcins ont été utilisés. Chaque poumon a subi 1h d'ischémie froide avant d'être placé sous PPEV GS (5 poumons) ou DP (4 poumons) pendant 12h. Durant la procédure, différents paramètres physiologiques ont été relevés toutes les heures : la pression artérielle pulmonaire, le poids du greffon, la température, la pression de crête, la pression de plateau ainsi que la compliance. Des échantillons de perfusats ont été collectés également toutes les heures permettant à la fois de réaliser : i) le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) par un test de cytotoxicité ii) la détection de cytokines inflammatoires par multiplex, iii) la détection du C5a par ELISA. Les échantillons de perfusats ont également permis de réaliser la mesure des gaz du sang et des électrolytes. Enfin, des biopsies pulmonaires ont été collectées après la période d'ischémie froide (0h), à 6h et 12h de PPEV, puis analysées par RNAseq.

Résultats : L'analyse des paramètres physiologiques montre que le poids du greffon à la fin de la procédure est similaire entre le groupe GS et DP. De même, la compliance ainsi que les échanges gazeux ne diffèrent pas d'un groupe à l'autre, tandis que la

pression artérielle pulmonaire est plus élevée dans le groupe DP comparé au groupe GS. Les concentrations ioniques de Na^{2+} et Cl^- restent faibles dans le groupe DP et augmentent dans le groupe GS. En revanche, la concentration en Ca^{2+} augmente dans le groupe DP plus que dans le groupe GS. Les niveaux de glucose et de lactate sont stables dans le groupe DP, tandis que le glucose diminue et le lactate augmente dans le groupe GS. Enfin, aucune différence n'est observée quant à l'expression de la LDH, ce qui suggère que les procédures n'augmentent pas la mortalité cellulaire. Ainsi, la présence de la membrane de DP améliore la composition du perfusats durant les 12h de PPEV tout en maintenant les fonctions respiratoires. L'analyse des cytokines inflammatoires par multiplex montre une augmentation des concentrations d'IL-6, IL-8, IL-1 β et d'IL-10 dans le groupe DP. En parallèle, l'analyse RNAseq des tissus montre une augmentation significative des transcrits dans le groupe DP pour *IL-6* à 12h, *IL1B* à 6 et 12h et *TNFA* à 6h comparé au groupe GS. Ainsi, la PPEV en présence de la membrane de DP augmente l'expression génique de diverses cytokines inflammatoires dans le tissu pulmonaire, ce qui se reflète au niveau protéique dans les perfusats. L'analyse de la génomique fonctionnelle des données RNAseq a été faite par deux méthodes, IPA d'une part et GSEA contre les bases de données Hallmark et Reactome d'autre part. Nous avons trouvé des enrichissements géniques prédictifs d'activation de la viabilité et de la prolifération cellulaire, d'activation des APCs et des MPs, d'une diminution des dommages des cellules pulmonaires et des mouvements cellulaires dans les deux groupes à 6 et 12h de PPEV ainsi qu'un enrichissement du métabolisme ARN dans le groupe DP à 12h. L'analyse de la génomique fonctionnelle, issue de la comparaison des niveaux d'expression versus 0h, a mis en évidence une activation significativement plus forte des cellules endothéliales à 6h et des voies de gènes de la signalisation cytokinique à 12h dans le groupe DP comparé au groupe GS. De plus, l'ajout d'une membrane de dialyse n'augmente pas l'activation du fragment de complément C5 (mesure de C5a) dans le perfusats à différents temps. Ainsi, l'activation du complément durant la PPEV n'explique pas la réponse inflammatoire plus forte

observée dans le groupe DP.

Conclusions : Nous avons montré que l'ajout d'une membrane de DP sur le circuit de PPEV permet de stabiliser les électrolytes et métabolites pendant 12h, tout en maintenant les fonctions respiratoires du poumon. Cependant, cette membrane favorise l'expression de gènes de cytokines inflammatoires dans le parenchyme pulmonaire, ce qui pourrait avoir des effets négatifs sur les résultats de la transplantation pulmonaire. L'activation du complément durant la PPEV n'explique pas la réponse inflammatoire plus forte observée dans le groupe DP. Il est possible que cet effet inflammatoire de la membrane soit dû au fait que cette dernière puisse éliminer des métabolites protecteurs qui sont synthétisés pendant la PPEV, et/ou favoriser l'accumulation de cytokines générant une boucle d'amplification pro-inflammatoire. Ainsi, cette étude souligne l'intérêt de la génomique fonctionnelle pour analyser la réponse biologique à la PPEV ainsi que les modifications pouvant être apportées au circuit afin d'améliorer la technique. Bien que présentant des résultats prometteurs dans les travaux initiaux, la dialyse associée au système de la PPEV devrait être davantage évaluée et améliorée avant d'être appliquée en clinique.

Contribution : Au cours de cette étude, j'ai participé à la réalisation d'une des expériences de PPEV en condition GS où j'ai procédé à la collecte et au stockage des différents échantillons. J'ai ensuite réalisé l'extraction d'ARN des biopsies collectées aux différents temps avant de les doser et de les apporter à la plateforme de séquençage. J'ai ensuite été formée, par l'ingénieur biostatisticien de l'UMR VIM, à l'analyse des données RNAseq à partir des fichiers fastq afin de réaliser les analyses bio-informatiques et statistiques des poumons GS et DP. J'ai également analysé nos différentes données de génomique fonctionnelle avec mon encadrante à l'aide du logiciel IPA. J'ai participé aux réunions d'analyse des données avec mon encadrante et l'ingénieur biostatisticien. Enfin, j'ai procédé à la présentation des différents résultats sous la forme de figures, que j'ai ensuite structurées pour la soumission de l'article.

Prolonged dialysis during *ex vivo* lung perfusion promotes inflammatory responses.

Si besoin, je peux fournir les documents additionnels dont la taille de certains n'est pas compatible avec une présentation sous forme de manuscrit de thèse

Julien De Wolf^{1,2#}, Carla Gouin^{2#}, Luc Jouneau², Antoine Premachandra², Florentina Pascale², Maxime Huriet², Jérôme Estéphan², Matthieu Glorion^{1,2}, Jean-Jacques Leplat³, Giorgia Egidy³, Christophe Richard⁴, Valérie Gélin⁴, Céline Urien², Antoine Roux^{2,5}, Morgan Le Guen^{2,6}, Didier Journois⁷, Isabelle Schwartz^{2*}, Edouard Sage^{1,2*}

1. Department of Thoracic Surgery and Lung Transplantation, Foch Hospital, Suresnes, France

2. Université Paris-Saclay, INRAE, UVSQ, VIM, 78350, Jouy-en-Josas, France

3. Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350, Jouy-en-Josas, France

4. Université Paris-Saclay, UVSQ, INRAE, BREED, MIMA2, CIMA, 78350, Jouy-en-Josas, France

5. Department of Pulmonology, Foch Hospital, 92150, Suresnes, France

6. Department of Anesthesiology, Foch Hospital, 92150, Suresnes, France

7. Université de Paris, 75006 Paris, France

equal contribution

* corresponding authors. Isabelle Schwartz : +33134652634 ; Edouard Sage: +33146252568

Running title: dialysis effects during EVLP

Abbreviations: *Ex vivo* lung perfusion (EVLP), Gold Standard (GS), Pediatric dialysis (PD), Lactate Dehydrogenase (LDH), Differentially Expressed Genes (DEGs), Fold changes (FC), Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

Abstract

Ex vivo lung perfusion (EVLP) has extended the number of transplantable lungs by reconditioning marginal organs. However EVLP is performed at 37°C without homeostatic regulation leading to metabolic wastes accumulation in the perfusate, and as a corrective measure, the costly perfusate is repeatedly replaced during the standard of care procedure. As an interesting alternative, a hemodialyzer could be placed on the EVLP circuit, that was previously shown to rebalance the perfusate composition, maintain lung function and viability without appearing to impact the global gene expression in the lung. Here, we assessed the biological effects of a hemodialyzer during EVLP by performing biochemical and refined functional genomic analyses over a 12 h procedure in a pig model. We found that dialysis stabilized electrolytic and metabolic parameters of the perfusate but enhanced the gene expression and protein accumulation of several inflammatory cytokines, and promoted a genomic profile predicting higher endothelial activation already at 6 h and immune cytokine signaling at 12 h. Therefore epuration of EVLP with a dialyzer, while correcting features of perfusate composition and maintaining respiratory function, promotes inflammatory responses in the tissue. This finding suggests that modifying the metabolite composition of the perfusate by dialysis during EVLP can have detrimental effects on the tissue response and that this strategy should not be transferred as such to the clinic.

Introduction

Ex vivo lung perfusion (EVLP) has been adopted by many lung transplantation centers around the world for reconditioning marginal donor lungs. Indeed donor lungs that present mild dysfunction recover full respiratory and circulatory properties thanks to EVLP, after being ventilated and perfused at normothermia with an adapted perfusing fluid including or not erythrocytes (1). EVLP therefore led to increasing the number of lung transplantations by about 20% (2), with similar or even better outcomes than the ones using conventional cold storage (1).

However EVLP presents limitations. Indeed after several hours of procedure, EVLP is systematically associated with oedema formation, that compromises gas exchange and leads to deterioration of lung function (3). In addition, many reports emphasize that EVLP induces inflammatory responses, which are likely induced by the ischemia-reperfusion response that inevitably occurs upon organ procurement and reperfusion (4). Importantly, the extent of the inflammatory response has been correlated with poor outcome (5-8). These negative responses to EVLP, particularly when prolonged, may also result from the extracorporeal preservation of the lung which is maintained metabolically active and accumulates metabolic wastes in absence of detoxification by liver and kidney (9). For mitigating this imperfect metabolic conditions, the costly perfusate fluid is regularly replaced, that impacts on the economic aspect of the procedure. Importantly, while EVLP is approved to support lung for 6 hours in clinical practice (10), longer durations are also desired to facilitate the operating room logistics and to permit cell recovery upon advanced therapeutic interventions (cell or gene therapy, immunomodulation).

In order to find a solution to improve and prolong EVLP as well as to decrease its cost, dialyzers were added to EVLP machines and experimentally tested on human lungs (11) and pig (12, 13). Overall satisfying conclusions were published, with maintenance of the perfusate composition, and possibly improved cell viability (11-13). In a recent work, we also reported that the transcriptomic changes induced by acellular EVLP in a pig model (Toronto protocol) appeared similar during a 6 h procedure when comparing different perfusate management techniques, i.e. no perfusate modification, repeated replacement, adult and pediatric dialysis (13). Altogether while addition of a dialyzer on the EVLP circuit appears feasible, more biological knowledge on the dialysis effect is needed to better capture the possible risks and benefits before transfer to the clinic. In this study, we assessed the effect of dialysis during a 12 hour procedure and performed extended biostatistical and predictive functional genomics analyses in the lung graft. Compared with perfusate replacement, we found that dialysis, while maintaining the lung function and correcting parameters of the perfusate electrolytic and metabolic composition during 12 h, induced a higher inflammatory cytokine accumulation in the perfusate as well as a genomic profile predicting increased permeability of vasculature and enhanced cytokine signaling.

MATERIAL AND METHODS

Ethics

The animal experiments were conducted in accordance with the EU guidelines and the French regulations (DIRECTIVE 2010/63/EU, 2010; Code rural, 2018; Décret n°2013-118, 2013). The procedures were evaluated and approved by the Ministry of Higher Education and Research. The experiments were approved by the COMETHEA ethic committee under the APAFIS notification number authorization number APAFIS#14942-2018020720215374 v4. The surgery was performed at the Medical Imaging in Animal platform (accreditation B78-322-2) and the animals were hosted at the Animal Genetics and Integrative Biology unit at INRAE-Jouy (accreditation C78-719).

Animals and lung extraction procedures

Nine Large-White pigs (50 ± 5 kg) provided the lungs that were harvested using a non-heart-beating donor model with a 10 min no touch, as described in details by us before (13).

EVLP and dialysis procedures

After one hour of cold ischemia, a 12-hour EVLP procedure was performed according to the Toronto protocol (14). The circuit was filled with 1.5 L of Steen® solution supplemented with 1 g methylprednisolone, 1.5 mg cefuroxime and 15000 UI heparin. A flow rate at 40% of the theoretical cardiac output was applied at normothermia. The pig lungs were allocated into two EVLP groups, one named Gold standard (GS, 5 pigs) in which 500 ml Steen® solution was replaced every 2 h, and the other named pediatric dialysis (PD, 4 pigs) in which a Continuous Venovenous Hemo-Dialysis mode applied on the circuit as described (13). The dialysis bath was based on Phoxilium® (Baxter, Deerfield, USA) and adjusted with suitable electrolytes. A AVpaed pediatric membrane (Fresenius, Bad Homburg vor der Höhe, Germany) of an effective surface area of 0.2 m² and a cut-off of 30 kDa was used and a flow rate of 50 ml/min was applied. The PD group included the same lungs as the ones utilized in (13) for the 6 h time point. The GS group is totally distinct (see the discussion).

EVLP monitoring, sample collections and biological dosages

During EVLP, pulmonary artery pressure, graft weight, temperature, ventilation peak pressure, ventilation plateau pressure and compliance were recorded every hour. Perfusates were collected hourly and frozen at -80°C for lactate dehydrogenase (LDH) and cytokine detection. Blood gases, electrolytes, and proteins were detected on fresh perfusates. The LDH was measured with the CytoTox 96 Non-Radio Cytotoxicity Assay (Promega, Madison, USA). Cytokines concentrations were assessed with a porcine cytokine magnetic bead panel kit, the Milliplex-MAP-Kit (PCYTMAG-23K-07, Millipore, Billerica, MA, USA), for the detection of TNF α , IL-8, IL-6, IL-10, IL-1 α , IL-1 β , and IL-1RA. The C5a was measured in the perfusates using Pig Complement C5a (C5a) ELISA Kit (Abxexa, Cambridge, UK). Lung biopsies were collected right after the cold ischemia period (0 h), at 6 h and 12 h and either frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C or stored in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, Crawley, UK) at -20°C.

RNA extraction, quality check and deep sequencing

Frozen lung biopsies were embedded in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura), cut in five 60 μ m slices from which total RNA was extracted using the Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus Life Technologies). Alternatively biopsies in RNeasy Lysis Buffer were placed in Trizol, homogenized with 1.4 mm ceramic beads in a Precellys 24 bead grinder homogenizer (Bertin

Technologies, St Quentin en Yvelines, France), and purified using the NucleoSpin RNA kit that includes a DNase digestion step (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA was checked for quality with an Agilent 2100 Bioanalyzer using RNA 6000 Nano Kits (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Directional RNA-Seq Libraries were constructed from 500 ng of total RNA using the *TruSeq mRNA Stranded library prep kit* (Illumina), following the manufacturer's instructions. The final libraries' quality was assessed with an Agilent Bioanalyzer 2100, using an Agilent High Sensitivity DNA Kit. Libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced in paired-end runs (50 nt forward-34 nt reverse) on an Illumina NextSeq500 instrument, using NextSeq 500 High Output 75 cycles kits. Demultiplexing has been done with bcl2fastq2 V2.2.18.12. Adapters were trimmed with Cutadapt1.15 and only reads longer than 10pb were kept.

Bioinformatic analyses

Sequences were aligned with tophat2 (v2.0.14; options: -N 2 --read-edit-dist 2 --b2-sensitive --no-coverage-search) on the porcine transcriptome (reference Ensembl Release 101, Sscrofa11.1). Gene counts were transformed using RLOG function of DESeq2 package (v1.18.1). In order to study the functional signatures of the gene expression changes between timing (12 h vs 0 h, 6 h vs 0 h) in the GS and PD groups (i.e. 4 conditions), we performed a differential expression analysis using the DESeq2 R package (v1.18.1) for paired data sets. The differential expression analysis included an independent hypothesis weighting batch correction and a Benjamini-Hochberg correction for multiple testing. The differentially expressed genes (DEGs) were selected based on an adjusted p-value below 0.05 and an absolute fold change mean value superior or equal to 2 (Supplemental DEG). The four DEG lists were used as input into functional enrichment analysis using the Hallmark geneset collection of the MSigDB and the Reactome geneset collection. The functional enrichments were selected based on a -Log₁₀ adjusted p-value superior to 3 and over 3 contributing genes in at least one of the four conditions. As the analysis using Reactome gave redundant results with Hallmark, we selected the Hallmark results. In addition the four DEG lists were submitted to an Ingenuity pathway Analysis (IPA, www.ingenuity.com, QIAGEN Silicon Valley, Redwood City, CA, edition 2019). The pre-analysis filtering on Tissues and Cell lines included endothelial cells, epithelial cells, fibroblasts, immune cells and lung. The association likelihood of the DEG sets with a given pathway/function is given by p-values calculated with the Right-tailed Fisher's Exact Test and the prediction of their activation or inhibition is given by z-scores (> 2 or < -2 respectively). The z-scores are calculated with an algorithm that integrates i) the expression orientation of the genes in the data set that contribute to the pathway/function and ii) the knowledge on these genes expression from experimental data published in peer-reviewed journals. The biologically relevant functions and pathways presenting at least an absolute z-score value > 2 and -Log₁₀ p-value > 1.3 with over 3 contributing genes in one of the four conditions were selected. We also proceeded to a differential expression analysis between 12 h vs 6 h in the GS and PD groups (Supplemental DEG) and we performed an enrichment analysis using the Hallmark and Reactome and IPA gene set collections as described above.

Finally we performed a comparative analysis of the gene expression fold changes (FC) at 6 h (6 h vs 0 h) and at 12 h (12 h vs 0 h) between the GS and PD group using a unpaired and non-parametric Wilcoxon, as the FC data did not pass a normality test. The comparison gene list was obtained from the FC comparison generating adjusted p-values below 0.05 with the Wilcoxon test (Supplemental FC) and it was submitted to functional enrichment analyses using the Hallmark and the Reactome gene set collections, and IPA. The functional enrichments with -Log₁₀ p-value > 3 and over 3 contributing genes were selected. As Hallmark results showed overlaps with Reactome and IPA results, only Reactome and IPA results were selected.

Statistical analyses

The physiological, electrolytic, metabolic, C5a and cytokine data were analyzed with the R Studio (v2023.03.1+446). A Shapiro test was used to evaluate the normality of the data distribution in each group and timing. The cytokine data were log transformed. When the data did not pass the normality test, a non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the data between 2 groups. Alternatively an unpaired t-test was used upon equal variance evaluation. The statistics of the genomic data are reported in the dedicated paragraph.

Results

Pediatric Dialysis corrects and stabilizes electrolytic and metabolic parameters during 12 h EVLP.

Based on the results of our initial study that showed no significant effect on the lung function and gene expression profiles of different perfusate managements over 6 h EVLP (13), we aimed at evaluating the effect of dialysis over a longer duration, i.e. 12 h. In that first study, we tested two methods of dialysis, referred to as Adult or Pediatric, that differed by the type of dialysis membrane and the applied flow rates. After 6 h procedure, the Adult Dialysis EVLP (40 kDa cut-off membrane) led to important edema accumulation in the organ possibly due to loss of components of the Steen perfusate through the adult dialysis membrane and was therefore abandoned. Conversely the weight gains at the end of the procedure, that can be used as proxies to estimate oedema, were similar in the Pediatric Dialysis (PD, 30 kDa cut-off membrane) and in the GS procedures (222 ± 107 gr for PD and 186 ± 106 gr for GS, mean \pm sd). The compliance and gas exchanges showed no differences between the PD and GS groups (Figure 1A). The pulmonary artery pressure was significantly higher in the PD group at several time points (Figure 1A, $p < 0.05$). The Na^{2+} and Cl^{-} ionic concentrations remained low in the PD group and increased in the GS group, and conversely the Ca^{2+} levels increased in the PD group more than in the GS group (Figure 1B, $p < 0.01$). The glucose and lactate levels remained stable in the PD group while the glucose steadily decreased and the lactate increased overtime in the GS group, indicating a better control of the glucose metabolism in the PD group (Figure 1C, $p < 0.01$ for lactate and glucose). The lactate dehydrogenase (LDH) did not differ between the two groups over 12 h, supporting that PD did not increase cell death in the lung (Figure 1C). Overall the improvement of composition of the perfusate induced by the PD process that we observed at 6 h was also confirmed at 12 h, with maintenance of respiratory functions.

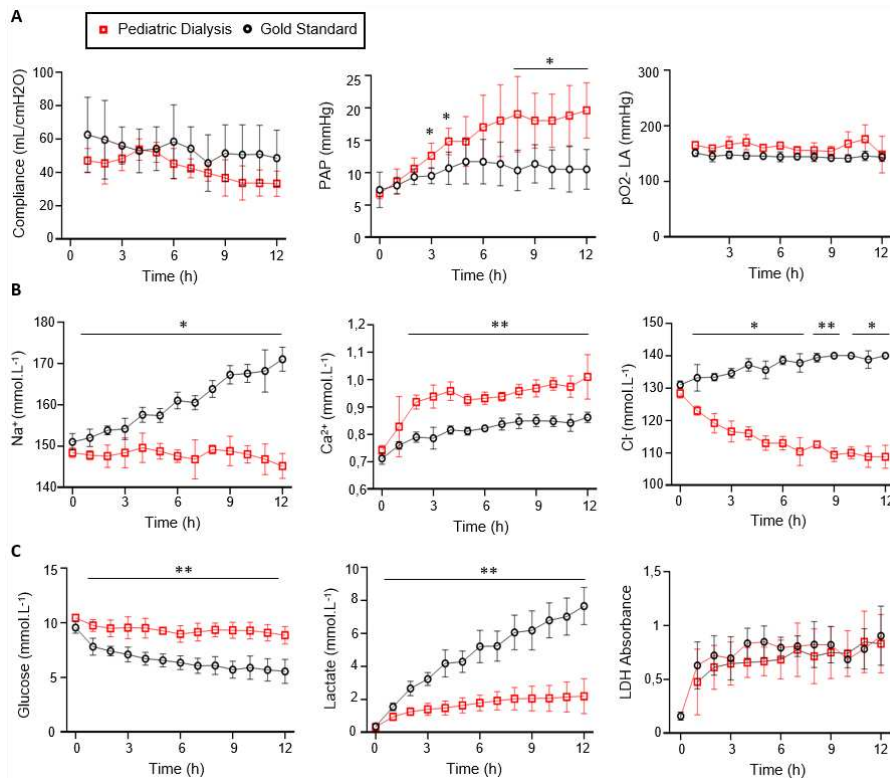


Figure 1. Monitoring of the physiological parameters (A), electrolyte (B) and metabolite (C) concentrations in the perfusates in the Gold Standard (5 pigs) and Pediatric Dialysis groups (4 pigs). A. From left to right: lung compliance, pulmonary artery pressure, pO₂ on FiO₂ 30%. **B.** From left to right: Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻ concentrations. **C.** From left to right: glucose, lactate, LDH absorbance.

lactate production, lactate dehydrogenase (LDH). To compare the data between the 2 groups, an unpaired t-test was used when the data passed the Shapiro normality test. For cases that did not pass the Shapiro normality test, a non-parametric Mann-Whitney test was performed. The p-value classes are reported as * = $p < 0.05$ or ** = $p < 0.01$ at specific time points. The highest p-value class common to several time points is reported above a line. The error bars represent standard deviations.

Pediatric Dialysis enhances the concentration of several inflammatory cytokines in the perfusate and enhances the expression of cytokine genes in the lung tissue.

We measured inflammatory cytokine levels in the perfusate, and we observed that cytokine levels tended to be higher in the PD group (Figure 2A); this is notably the case for Interleukin-6 (IL-6) at 10 h ($p = 0.06$) and 12 h ($p = 0.08$), IL-8 at 6 h ($p < 0.01$), IL-1 β at 6 h ($p = 0.05$), at 10 h ($p = 0.08$) and at 12 h ($p < 0.05$) and IL-10 at all timing from 6 h ($p < 0.01$). Higher levels of IL-6 and IL-10 at 6 h were also found in the PD group in our first study (13). No cytokine could be detected in the dialysis bath. In order to determine whether this finding could be related to increased gene expression in the tissue, we proceeded to RNA-seq analysis of the lung tissue at 0 h, 6 h and 12 h and compared the fold changes (FC, 6 h vs 0 h and 12 h vs 0 h) of the different cytokine mRNA counts between the PD and GS groups (Figure 2B). We observed higher levels of upregulated transcripts in the PD group for *IL6* at 12 h, *IL1B* at 6 h and 12 h, and *Tumor Necrosis Factor A (TNFA)* at 6 h. However no significant difference of transcript levels was found between the two groups in the case of the *IL10* gene.

Thus altogether, the EVLP with PD increased the expression of several cytokine genes in the lung tissue and led to higher levels of several cytokine proteins in the perfusate, despite the process of dialysis through a 30 kDa membrane.

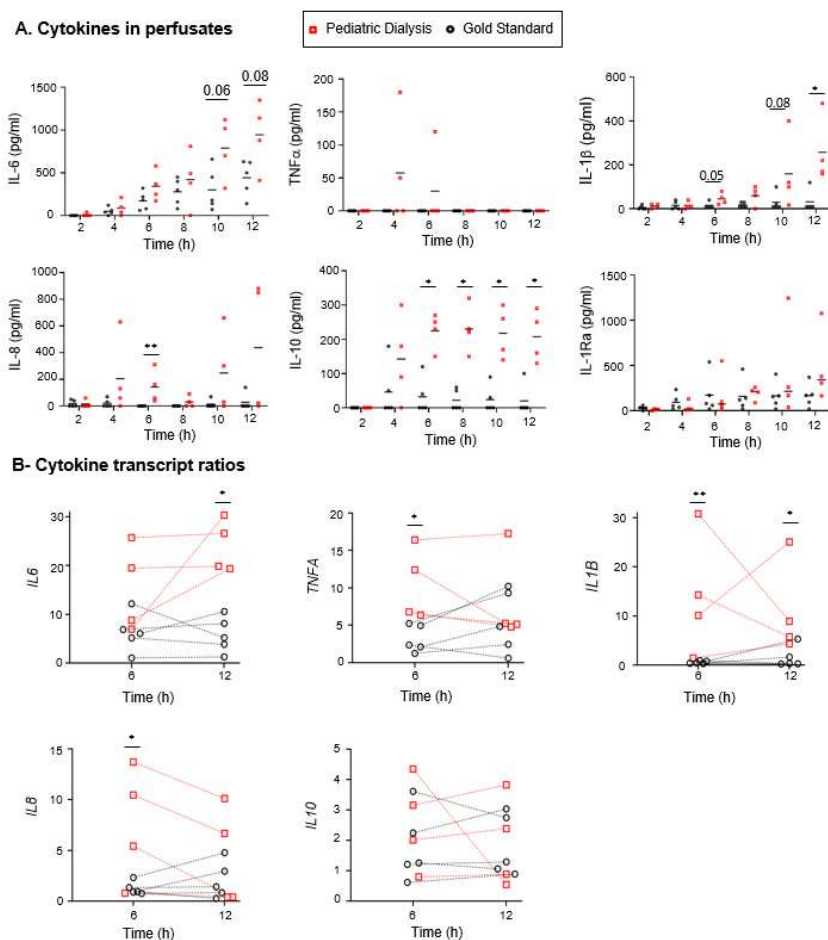


Figure 2. Cytokine protein and transcript analyses in the Gold Standard and Pediatric Dialysis groups. **A.** Cytokines were detected in the perfusates using a porcine cytokine magnetic bead panel kit. At specific time points, when the data followed a normal distribution after Log10 transformation, a t-test was used to compare the data between the two groups; alternatively a non-parametric Mann-Whitney test was used, * = $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or exact value in case of tendency. **B.** The cytokine gene expression ratios were established from the RNA-seq gene counts at 6 h and 12 h divided by the gene counts at 0h. The same statistical analysis was done as in A at specific time points.

Pediatric Dialysis and Gold Standard both activate gene expression pathways related to inflammatory responses and activation of antigen-presenting cells.

In order to examine the overall modulation of gene expression induced by EVLP in the GS and PD conditions, the differentially expressed gene (DEG) lists between 6 h vs 0 h and 12 h vs 0 h generated from the global RNA-seq results were submitted to a functional enrichment analysis (see Material and methods, Supplemental-DEG, Supplemental-Enrichment-DEG 6 h vs 0 h & 12 h vs 0 h, Figure 3A). The enrichment analysis using the Hallmark data base showed that the TNF α Signaling via NF κ B and the Inflammatory response were the top-enriched pathways (adjusted p -value < 0.001) in both groups at 6 and 12 h. The enrichment of these inflammation-related functions was associated to the significant upregulation of the *CSF3*, *IL6*, *TNFA*, *TNFAIP3*, *MAP2K3*, *MAFF*, *REL* genes in all groups and timings (Supplemental-DEG, Supplemental-Enrichment-DEG 6 h vs 0 h & 12 h vs 0 h, Figure 3A). The DEG lists and their statistical parameters were uploaded to the Ingenuity Systems (IPA), a software that predicts modulation of functions and pathways by integrating the orientation of gene expression modulation and a scientific literature-based database. The downstream analysis of IPA predicted the activation of the ERK5-, HMGB-, IL-6- and IL-17- signaling pathways, the inhibition of the PPAR pathway, as well as the activation of production of nitric oxide and reactive oxygen species in macrophages- and of Dendritic cell maturation- pathways (absolute z -score > 2), both in the GS and PD groups (Supplemental-Enrichment-DEG 6 h vs 0 h & 12 h vs 0 h, Figure 3B). IPA also showed the activation of Cell proliferation and viability, Activation of antigen-presenting cells and of macrophages, Reduction of lung cell damage, and Activation of Cell movement (absolute z -score > 2 (Figure 3C). Finally we submitted the DEG lists between 12 h and 6 h (Supplemental-DEG) to functional enrichments. The sole significant functional enrichment was found in the case of the PD group using the Reactome data base, that revealed enrichment for the metabolism of RNA (Supplemental-Enrichment-DEG 12 h vs 6 h).

Overall the functional genomic analysis of the PD and GS group RNA-seq data predicted stimulated viability and activation of innate immune responses in both groups at 6 h and 12 h EVLP.

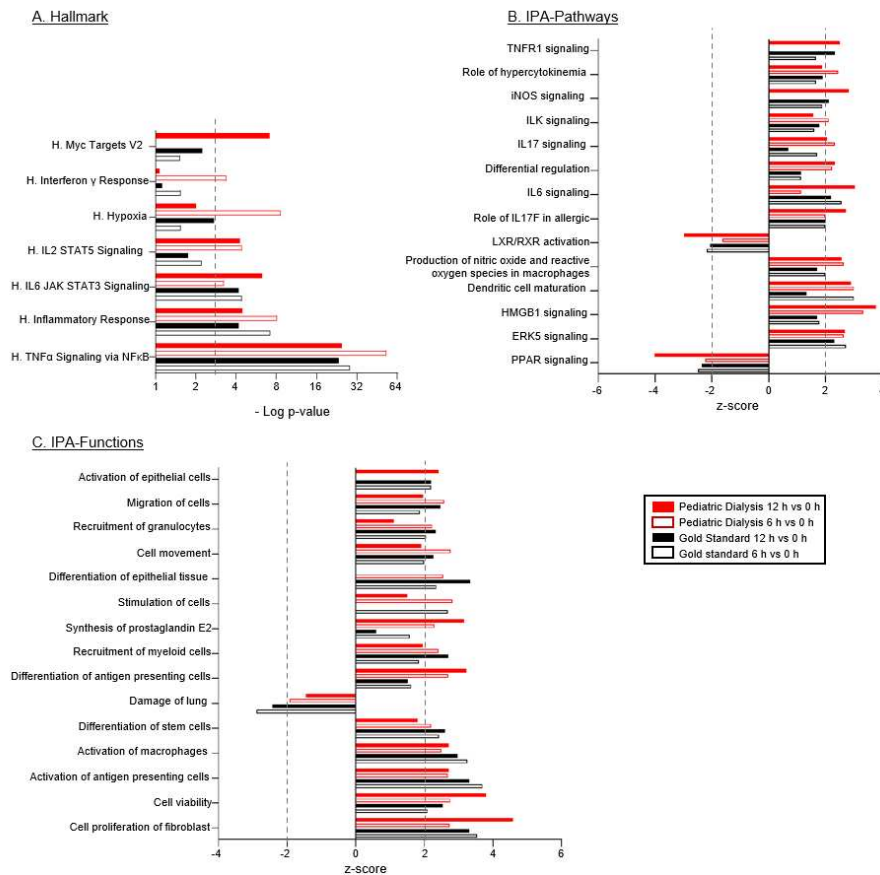


Figure 3. Functional enrichments and predictions of modulated pathways/functions induced by EVLP in the Gold Standard and Pediatric Dialysis groups. Differentially expressed gene lists (DEGs) were established from the RNA-seq results of lung tissue undergoing EVLP at 6 h versus 0 h and at 12 h versus 0 h, in the Gold Standard and Pediatric Dialysis groups. **A.** The DEGs were subjected to a functional enrichment analysis using the Hallmark gene sets. The functional enrichments were selected based on a $-\log_{10}$ adjusted p-value superior to 3 and over 3 contributing genes in at least one of the four conditions. **B and C.** The DEGs were loaded and processed through the IPA core analysis for identification of predicted activated or inhibited canonical pathways (**B**) and functions (**C**) that were selected based on their biological relevance, absolute value of z-score superior to 2 with a $-\log_{10}$ p-value superior to 1.3 and over 3 contributing genes, in at least one of the 4 cases. The 15 top functions/pathways are shown. The contributing genes to the functional enrichments are reported in Supplemental-Enrichment-DEG 6 h vs 0 h & 12 h vs 0 h.

Pediatric Dialysis stimulates higher expression of gene modules related to endothelial activation at 6 h and cytokine signaling and metabolism of RNA at 12 h.

In several instances, the z-scores of the IPA downstream analysis of the DEGs between 6 h vs 0 h and 12 h vs 0 h appeared higher in the PD than in the GS group (Figure 3C) and Figure 1 indicated higher expression ratios of several cytokine genes in the PD group. We thus aimed at comparing the gene expression FC at 6 h and at 12 h between the GS et PD groups, using a non-parametric Wilcoxon statistical test. We investigated the functional enrichment of the genes with statistically different FC between the two groups, using IPA and Reactome databases (Supplemental-FC, Figure 4A). At 6 h, the genes with higher FC in the PD group were enriched for Nitric Oxide Signaling, Stimulation of endothelial cells and Permeability of vasculature, with contributing genes including *C-C Motif Chemokine Ligand 4 (CCL4)*, *IL1B*, *TNFA*, *Endothelial Tyrosine Kinase (TEK)* (Figure 4A and 4B). At 12 h the genes with higher FC in the PD group had enriched profiles related to Cytokine Signaling in Immune system, with higher expression FC of *Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1)*, *LIF Interleukin 6 Family Cytokine (LIF)*, *IL6*, *IL24*, *Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator (CIITA)*, *CD40*, *CCL4* (Figure 4A and 4B). Finally an enrichment for Metabolism of RNA was found for

the FC that were higher in the PD than in the GS group at 12 h (Figure 4A and 4B).

Altogether the comparison of the FC between the GS and PD group shows that endothelial cell activation at 6 h and cytokine signaling gene pathways at 12 h were statistically more engaged in the PD group than in the GS group.

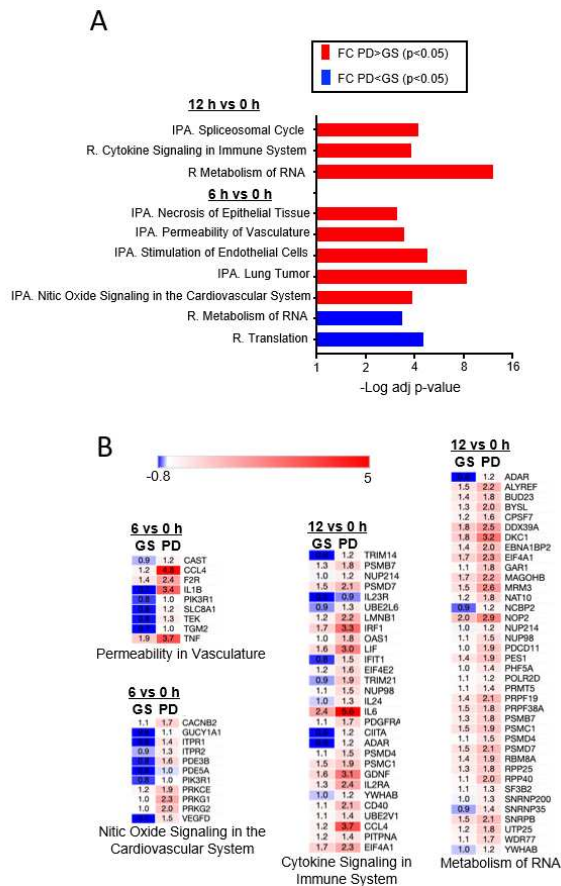


Figure 4. Functional enrichments of the gene expression comparisons between the Gold Standard and Pediatric Dialysis groups. **A.** A Wilcoxon test was performed to compare the expression fold change (FC) at 6 h and 12 h between the two groups. An adjusted p-value of 0.05 was used to filter the genes of the expression ratio comparisons and the resulting gene lists were subjected to an enrichment analysis using the IPA and Reactome datasets. The enriched functions with $-\text{Log}_{10}$ p-values > 3 and > 3 contributing genes were selected. The enriched functions in the comparison of FC that is higher in the Pediatric Dialysis group are in red; they are blue when the comparison of FC is higher in the Gold Standard group. **B.** The mean gene fold changes of the contributing genes of some of the enriched functions shown in A are illustrated as a heat map, in blue when down-modulated and in red when up-regulated at the reported timing versus 0 h.

The dialysis process does not lead to higher C5 complement activation in the circuit

Dialysis membrane can lead to complement activation, notably of C5 (15). Complement is produced mainly by the liver, but it can also be produced by lung cells, in particular immune cells. Activated complement C5a, if released in the circuit and activated upon membranes, might recirculate to the lung and activate the inflammatory response in the tissue, leading to a feed forward loop. We tested this hypothesis by measuring C5a in the perfusates at 7, 9 and 11h. While C5a was indeed detected in the two groups (range 0.8 – 1.7 ng/ml in the GS group and 0.4 – 0.85 ng/ml in the PD group), there was no statistically significant difference of release in the two groups, and even a tendency of lower levels upon dialysis (Figure 5). Therefore C5 complement activation occurs during EVLP but does not explain the higher inflammatory response induced by the dialysis process.

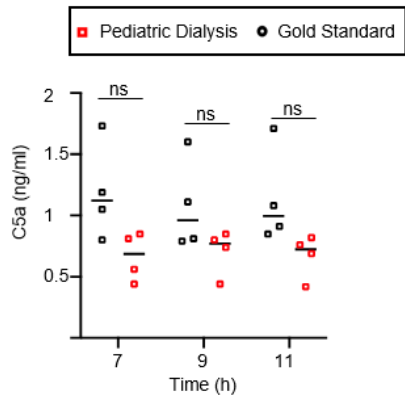


Figure 5. C5a levels in the Gold Standard and Pediatric Dialysis groups. The porcine C5a was detected by ELISA in the perfusates. The raw data followed a normal distribution with equal variance, and were compared between the two groups with an unpaired t-test. No statistically significant difference was found.

Discussion

We report here that a dialysis added to the Toronto protocol better balanced the electrolyte and metabolite composition of the perfusate than the standard of care periodic replacement of the perfusate during a 12 h procedure but led to increased accumulation of inflammatory cytokines in the perfusate and higher gene activation related to endothelial activation at 6 h, and cytokine signaling pathways at 12 h.

The transcriptomic analysis revealed the prediction of activation of the ERK5-, HMGB-, IL-6- and IL-17- signaling pathways and inflammatory responses in both GS and PD groups, similarly to what we previously published for the 6 h time point in our previous study (13). As stated in the material and method, the PD group is the same in the two studies, except that the sole 6 h time point was analyzed in our first study (13), whereas the GS group is totally distinct in the two studies. Furthermore, the differential expression of the genes versus 0 h (before EVLP initiation) was calculated differently in the two studies: in the first study (13), the differential expression was calculated relatively to ten unpaired lung tissues at 0 h, whereas here, the differential expression was calculated relatively to the same paired lung tissue at 0 h. Most conclusions of the DEG functional enrichments are similar between the two studies, supporting the robustness of the results. However the results of the present study are stronger as they include paired analyses, and they were refined by a comparative gene expression fold change analysis (see below).

While metabolites and electrolytes steadily increased in the GS group over 12 h, we could not detect significant modification of the transcriptome between 6 h and 12 h. These results confirm the finding obtained with human lungs undergoing EVLP for 12 h, using microarray technology (6). However in the PD group, genes related to RNA metabolism were differentially expressed at 12 h vs 6 h, suggesting a higher global cellular activity over time in this group. However bulk analysis of RNA-seq may mask effects of prolonged EVLP on specific lung subsets, therefore single cell RNA-seq technology could be used to refine these conclusions and better evaluate the suspected alteration that EVLP generates overtime, given the absence of systemic regulation (renal, hepatic, pancreatic, neurohormonal).

The important and new finding of the present study resides in the significantly higher cytokine signaling pathway observed in the PD than in the GS group, particularly at 12 h. This finding was revealed by the comparative gene expression fold change analysis that could not be done in our previous study (because the 0 h samples were not available in the GS group) and also by extending the EVLP to a 12h duration. Of note, in (13), higher levels of IL-6 and IL-10 were obtained in the perfusate, a finding that is also confirmed here and extended to IL-8 and IL-1 β . Higher levels of inflammatory cytokines (IL-6 and IL-10) in the perfusates of EVLP purified by dialysis were also reported by another group, with human lungs declined for transplantation, although this finding was not emphasized (11).

The prediction for higher activation of endothelial cells and Nitric Oxide Signaling in the PD group detected at 6 h may be consistent with the higher pulmonary arterial pressure that was observed in the PD group in this study as well as in the previous one (13). Indeed endothelial gene activation induced by PD might lead to increased vascular resistivity, leading to higher pulmonary arterial pressure. However this finding was not obtained in the human study with dialysis on the EVLP circuit (11).

Several hypotheses can be proposed to explain the higher inflammatory responses induced by PD vs GS. We excluded the hypothesis that C5 activation by the dialysis membrane could be involved. PD also leads to a modified ionic/metabolite balance that may affect inflammatory response regulation. For instance, lactate that acts through the G protein-coupled receptor 81 (GPR81) to regulate immune cells (16) may participate to the control of the inflammatory

response during EVLP and it is filtered out by dialysis; while it appears that C5a is probably partially filtered out as the levels tended to be lower in the PD group, other compounds such as vitamin C, inhibitors of complement and soluble receptors of cytokines that mitigate inflammation may also be filtered out. The levels of cytokines in the perfusate would have been expected to decrease by being filtered out through the 30 kDa pore of the membranes, as the molecular weight of the tested cytokines lie between 8 and 20 kDa in their monomeric form. However in patients, hemodialysis and filtration are known to be poorly effective at decreasing inflammatory cytokines from the circulation (17). In particular IL-10, TNF α , IL-6 are not effectively cleared with these methods, possibly due to homo/hetero multimerization phenomenon that lead to molecular forms of higher molecular weight than the pore size (17). In addition in our system, heparin which is administered in the perfusate at relatively high dose (10 UI/ml) may capture some of the cytokines and impede their elimination. Accordingly, we could not detect any cytokine in the cytokine bath. In addition, the repeated replacement of the perfusate in the GS group may also lead to reduction of cytokine concentration comparatively to the conditions of the close circuit of the PD group, especially if the cytokine is not well filtered out. In any event the increase in inflammatory cytokine expression in the PD group may be deleterious to the outcome of transplantation. Indeed IL-6 and IL-8 are biomarkers of poor outcome post EVLP (8, 18, 19). Cytokine signaling might promote activation of innate cells including antigen-presenting cells, favoring primary graft dysfunction occurrence and rejection events (20).

Our study includes several limitations. First it remains possible that the dialysis protocol that we used (type of membrane, dialysis bath, flow rate) is not optimal. Secondly the lungs of the GS and PD should be grafted in order to confirm that the predicted PD-engendered increased cytokine gene pathway activation leads to deleterious outcomes as compared to the standard protocol with the regular replacement of the costly Steen® perfusate.

Conclusion: We document that perfusate clearance with addition of dialysis on the EVLP circuit stabilizes electrolytic and glucose metabolic parameters over a 12 h duration with maintenance of respiratory functions, but promotes the expression of inflammatory cytokine gene modules in the lung parenchyma that might have negative effects on the lung transplantation outcomes. We propose that dialysis may remove protective metabolites that are synthesized during EVLP and/or favors the accumulation of cytokines generating a pro-inflammatory feed-forward loop. This work emphasizes the interest of functional genomics to analyze the biological response to EVLP and its modifications. Although presenting seducing results in initial works, dialysis in EVLP should be further evaluated and improved before translation to the clinic.

Acknowledgements

We warmly thank the "Installation expérimentale porcine" of the GABI unit for their dedicated help with the pig experiment and in particular Pascal Lafaux and the Pig Physiology and Phenotyping Experimental Facility (<https://doi.org/10.15454/1.5573932732039927E12>) in particular Nelly Muller and Eloïse Delamaire. The surgery was done thanks to the Surgery platform facility CIMA, DOI: MIMA2, INRAE, 2018. Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods, <https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12> and we particularly thank Valerie Gelin for her assistance in the EVLP experiments. We are grateful to Mathilde Dupont-Nivet (GABI), Pascale Chavatte-Palmer (BREED) and Sabine Riffault (VIM) for their support. We thank the genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, <https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12>) for providing help and/or computing and/or storage resources". This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing core facility of I2BC (Centre de Recherche de Gif - <https://www.i2bc.paris-saclay.fr/>) The study was financed by Agence de la Biomédecine, by

Fondation Foch (fondation-foch.com) and by VIM-INRAE internal support.

Author participation

J.DW. : participated to the design of the study, performed the pig surgery and the EVLP experiment.

C.G.: performed biostatistical and functional genomic analyses, performed cytokine dosages, generated the figures.

L.J.: performed and supervised the bioinformatics and biostatistical analyses of the genomic data.

A.P.: performed cytokine dosages and data analyses

F.P.: performed the C5a analysis

A.P.: performed the C5a analysis and provided major insight into the interpretation of the results

M.G.: participated to the design of the study and to the pig surgery.

M.H.: participated to the pig surgery, sample collection and RNA extraction

J.E.: performed LDH measurements and statistical analyses of the physiological data and of the perfusate data and participated to the drawing of figure 1.

J.-J.L.: managed animal experiment, wrote the ethic application.

G.E.: managed the animal facility platform.

C.R.: managed the surgery platform and assisted the surgery.

C.U.: performed the RNA extractions and quality check.

A.R.: participated to the design of the study.

M. LG.: participated to the design of the study.

D.J.: participated to the design of the study and provided his expertise in the dialysis procedure management.

I.S.-C.: participated to the design of the study, supervised the biological analyses, performed functional genomics analyses, wrote the manuscript.

E.S.: conceptualized, designed and supervised the whole study, raised funding.

Availability of data and materials

The RNA sequencing data supporting the conclusions of this article (.fastq files) are available in the repository from the Gene Expression Omnibus under the accession number XXXX. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the corresponding authors.

References

1. Yu J, Zhang N, Zhang Z, Li Y, Gao J, Chen C, et al. Diagnostic and Therapeutic Implications of Ex Vivo Lung Perfusion in Lung Transplantation: Potential Benefits and Inherent Limitations. *Transplantation*. 2023;107(1):105-16.
2. Ghaidan H, Fakhro M, Andreasson J, Pierre L, Ingemansson R, Lindstedt S. Ten year follow-up of lung transplantations using initially rejected donor lungs after reconditioning using ex vivo lung perfusion. *J Cardiothorac Surg*. 2019;14(1):125.
3. Niikawa H, Okamoto T, Ayyat KS, Itoda Y, Farver CF, McCurry KR. The protective effect of prone lung position on ischemia-reperfusion injury and lung function in an ex vivo porcine lung model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;157(1):425-33.
4. Watanabe T, Cypel M, Keshavjee S. Ex vivo lung perfusion. *J Thorac Dis*. 2021;13(11):6602-17.
5. Lonati C, Bassani GA, Brambilla D, Leonardi P, Carlin A, Favarsani A, et al. Influence of ex vivo perfusion on the biomolecular profile of rat lungs. *FASEB J*. 2018;32(10):5532-49.
6. Yeung JC, Zamel R, Klement W, Bai XH, Machuca TN, Waddell TK, et al. Towards donor lung recovery-gene expression changes during ex vivo lung perfusion of human lungs. *Am J Transplant*. 2018;18(6):1518-26.
7. Sadaria MR, Smith PD, Fullerton DA, Justison GA, Lee JH, Puskas F, et al. Cytokine expression profile in human lungs undergoing normothermic ex-vivo lung perfusion. *Ann Thorac Surg*. 2011;92(2):478-84.
8. Machuca TN, Cypel M, Yeung JC, Bonato R, Zamel R, Chen M, et al. Protein expression profiling predicts graft performance in clinical ex vivo lung perfusion. *Ann Surg*. 2015;261(3):591-7.
9. Shin J, Hsin MK, Baciu C, Chen Y, Zamel R, Machuca T, et al. Use of metabolomics to identify strategies to improve and prolong ex vivo lung perfusion for lung transplants. *J Heart Lung Transplant*. 2021.
10. Pan X, Yang J, Fu S, Zhao H. Application of ex vivo lung perfusion (EVLP) in lung transplantation. *J Thorac Dis*. 2018;10(7):4637-42.
11. Wei D, Gao F, Yang Z, Wang W, Chen Y, Lu Y, et al. Ex vivo lung perfusion with perfusate purification for human donor lungs following prolonged cold storage. *Ann Transl Med*. 2020;8(3):38.
12. Buchko MT, Himmat S, Stewart CJ, Hatami S, Dromparis P, Adam BA, et al. Continuous Hemodialysis Does Not Improve Graft Function During Ex Vivo Lung Perfusion Over 24 Hours. *Transplant Proc*. 2019;51(6):2022-8.
13. De Wolf J, Glorion M, Jouneau L, Estephan J, Leplat JJ, Blanc F, et al. Challenging the Ex Vivo Lung Perfusion Procedure With Continuous Dialysis in a Pig Model. *Transplantation*. 2021;106(5):979-87.
14. Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M, et al. Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27(12):1319-25.

15. Ehlerding G, Erlenkotter A, Gaulty A, Griesshaber B, Kennedy J, Rauber L, et al. Performance and Hemocompatibility of a Novel Polysulfone Dialyzer: A Randomized Controlled Trial. *Kidney360*. 2021;2(6):937-47.
16. Luo Y, Li L, Chen X, Gou H, Yan K, Xu Y. Effects of lactate in immunosuppression and inflammation: Progress and prospects. *Int Rev Immunol*. 2021:1-11.
17. Heering P, Morgera S, Schmitz FJ, Schmitz G, Willers R, Schultheiss HP, et al. Cytokine removal and cardiovascular hemodynamics in septic patients with continuous venovenous hemofiltration. *Intensive Care Med*. 1997;23(3):288-96.
18. Sage AT, Richard-Greenblatt M, Zhong K, Bai XH, Snow MB, Babits M, et al. Prediction of donor related lung injury in clinical lung transplantation using a validated ex vivo lung perfusion inflammation score. *J Heart Lung Transplant*. 2021;40(7):687-95.
19. Ghaidan H, Stenlo M, Niroomand A, Mittendorfer M, Hirdman G, Gvazava N, et al. Reduction of primary graft dysfunction using cytokine adsorption during organ preservation and after lung transplantation. *Nat Commun*. 2022;13(1):4173.
20. Shepherd HM, Gauthier JM, Li W, Krupnick AS, Gelman AE, Kreisel D. Innate immunity in lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2021.

4 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

4.1 LES LIMITES DU MODELE « POUMON ENTIER »

Le modèle d'infection du poumon entier que nous avons évalué dans ce travail présente des avantages attractifs pour l'étude des infections respiratoires. Parmi les avantages, il permettrait d'analyser des cinétiques d'infection en prélevant des échantillons à différents temps sur un poumon humain *ex situ*, donc directement accessible et respectant les rapports micro-anatomiques. Dans notre étude, nous avons ainsi pu collecter des échantillons à 0, 30min, 5h et 10h post-nébulisation virale. Ces différents échantillons nous ont permis d'étudier l'interaction virale avec les cellules pulmonaires aux temps précoces de l'infection et montrer le tropisme initial majeur pour les MPs, notamment les AMs et MoMacs, démontrant ainsi l'implication de ces deux populations, dans la capture du SARS-COV-2 (voir Figure 8). Cependant, il faut le souligner, l'utilisation de ce modèle s'avère complexe et présente des limites dont je vais discuter ci-dessous.

D'abord la mise en place d'un tel modèle nécessite l'implication d'une équipe d'au minimum 7 personnes qui doivent être mobilisables 24h sur 24, en attente de la disponibilité d'un greffon. Ce dernier doit être refusé pour la transplantation mais être dans un état acceptable pour l'expérimentation, donc rare. Si on compte le prélèvement par les chirurgiens (et donc l'information à tous les acteurs), l'arrivée au laboratoire, la mise sur circuit du poumon, les 10h de PPEV puis toutes les étapes nécessaires à la dissociation tissulaire jusqu'à la préparation du premier ADNc double brin qui permet de faire une première pause, il faut compter en moyenne 42h de travail continu avec relai progressif entre chirurgiens et biologistes. Ainsi, cela représente une organisation importante, complexe, et physiquement très éprouvante, et ceci dans la durée (plus d'un an ici). Une autre considération importante à avoir à l'esprit avec ce

modèle concerne la variabilité inter-patients. En effet, chaque personne est différente que ce soit au niveau de son patrimoine génétique, de son exposition à différents facteurs environnementaux ou de son historique médical. De plus, les poumons utilisés dans nos expériences sont refusés pour la transplantation, cela implique que l'état de ces poumons n'est pas optimal, bien que tout à fait satisfaisants sur le plan macroscopique selon les chirurgiens. Ainsi, cette variabilité et l'état des poumons pourraient expliquer les différences de comportement observées entre les donneurs, notamment pour le donneur 1 qui n'a pas montré d'association virale. Concernant les contrôles, on a aussi observé que le donneur 5 présentait des réponses à la PPEV nettement plus inflammatoires que le donneur 4.

Lorsqu'on s'intéresse aux limites de la technique en elle-même et comme nous l'avons soulevé dans la partie 1.8 de l'introduction, l'application prolongée de la PPEV induit l'apparition d'un œdème pulmonaire de manière quasi-systématique, ainsi on ne peut pas utiliser ce modèle sur des temps très longs. Dans notre étude, la PPEV est appliquée pendant une durée de 10h, ce qui peut être trop juste pour observer une transcription et réplication virale. Les travaux *d'Eymieux et al* avec la lignée VEROE6, une lignée cellulaire de référence pour ce virus, montrent que l'expression d'ARN viral est détectée à 4h post-infection puis augmente jusqu'à 10h où elle atteint un plateau²¹⁴. Nous espérons que la durée de 10h de notre modèle permette également d'observer une accumulation d'ARN viral. Cependant, l'analyse par RT-qPCR visant l'ARN viral de nos échantillons prélevés à 30min, 5h et 10h post-nébulisation n'a pas permis d'observer de synthèse d'ARN viral au cours du temps, bien que nous ayons détecté la bonne dispersion du virus dès les 30min post-nébulisation. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats : i) l'inoculum viral cache la réplication virale ii) la dose virale n'est pas suffisante pour l'infection de poumon entier et iii) la durée n'est pas assez longue.

- i) Au niveau pulmonaire les cellules cibles sont rares, le peu de transcrits nouvellement formés suite à l'infection pourraient se retrouver noyé dans le signal de l'inoculum viral de départ et ne pas être détecté par la RT-qPCR.
- ii) Dans notre modèle, nous avons mis la dose maximale dont nous disposions pour la nébulisation sans avoir la certitude que cette dose était suffisante. En effet, à l'heure actuelle aucun consensus n'a été établi concernant la dose minimale nécessaire à l'infection pulmonaire chez l'Homme. Une étude britannique utilise seulement 10 TCID₅₀ afin d'infecter des patients sains¹⁵², alors que dans nos poumons infectés nous avons utilisé au minimum une dose virale de 10⁷ PFU et au maximum 1.2x10⁸ PFU par poumon (en sachant que 1 TCID₅₀ est environ égal à 0.7 PFU). Toutefois, chez un patient, la réplication se fait initialement dans les voies aériennes supérieures, donc on ignore quelle dose atteint finalement le poumon.
- iii) Enfin, la durée pourrait ne pas être assez longue afin de vraiment pouvoir détecter une transcription et réplication virale, car les conditions du modèle poumon entier et VEROE6 sont évidemment très différentes. Il serait intéressant de tester ce modèle avec d'autres virus respiratoires, plus infectieux pour le poumon et ayant des cycles réplicatifs rapides. En effet, plusieurs études avec des explants pulmonaires montrent par exemple que le virus grippal est beaucoup plus infectieux et inducteur de réponses comparé au SARS-CoV-2^{126,204}.

Le protocole clinique de conduite de la PPEV utilise des médicaments qui pourraient interférer avec l'infection. En effet, dans le système de PPEV il est classiquement ajouté des corticoïdes ainsi que de l'héparine dans le liquide de perfusion au début de la procédure. Or, cette utilisation dans notre contexte d'étude des infections virales pourrait altérer nos résultats de par l'effet anti-inflammatoire des corticoïdes,

ainsi que par le potentiel blocage des récepteurs à l'infection par l'héparine. Néanmoins, la présence des corticoïdes ne suffit pas pour abroger les réponses inflammatoires, comme on l'a vu dans la partie 3.1 des résultats. De plus, en modèle porcin, mon équipe a montré que les corticoïdes ont peu d'effets sur l'expression d'ARNm sur laquelle notre étude est centrée (i.e. peu d'effets génomiques), par contre ils ont des effets non-génomiques en agissant sur les voies de transduction. Ainsi, il est nécessaire d'évaluer soigneusement les conséquences possibles de ces deux composants sur les interactions virales et cellulaires et voir s'il est possible de les enlever de ce système pour éviter tout biais possible.

Nos résultats de la partie 3.1 des résultats ont montré que l'utilisation de la PPEV seule sur le poumon induisait une réponse inflammatoire à différents niveaux. La mise en évidence de telles réponses inflammatoires qui pourraient être préjudiciables en raison de l'activation qu'elle pourrait engendrer sur les APCs, montre néanmoins des résultats plus que satisfaisants en post-transplantation. Toutefois, cette induction inflammatoire pourrait affecter nos résultats d'interaction avec le SARS-CoV-2, et notamment fortement interférer sur leurs possibilités de réponses. Ainsi lorsqu'on compare nos poumons contrôles aux poumons infectés par nébulisation, l'analyse de génomique fonctionnelle de l'expression différentielle des gènes (DEGs) n'a révélé aucune différence significative au niveau des voies biologiques qui seraient spécifiques de l'infection. Ces réponses inflammatoires observées au cours de la PPEV pourraient être le résultat de l'ischémie-reperfusion prenant place lorsque l'organe privé d'oxygène est placé sur circuit et dont la reperfusion induit un apport massif d'oxygène, conduisant à une réponse inflammatoire importante et délétère, comme nous l'avons décrit dans la partie 1.8.4.1 de l'introduction. Il est à noter que ce phénomène d'ischémie-reperfusion existe dans les modèles d'explants pulmonaires, mais n'est généralement pas pris

en compte, à ma connaissance. En effet, j'ai utilisé le modèle d'explants pulmonaires humains *in vitro* afin de les infecter avec le SARS-CoV-2 et tester des paramètres de dose virale et durée (étude préliminaire). Ce modèle d'explants ne m'a pas permis de détecter d'augmentation d'expression virale par RT-qPCR ni par plaque assay et pas d'augmentation d'expression de gènes inflammatoires (*TNFA*, *IL6*, *IFNA*, *MX*). En revanche, j'ai observé une forte induction de l'expression des gènes *CXCL1* et *IL6*, et variable selon les cas pour le *TNFA*, induite par la simple mise en culture (Figure 9). Ainsi, l'induction de réponses inflammatoires obtenue avec des explants est semblable à celle observée avec la PPEV. Par conséquent, alors que le modèle d'explant est très utilisé, il pourrait également y avoir un biais d'interférence entre la réponse à l'ischémie-reperfusion et la réponse aux virus en général. En conclusion, bien que ce modèle soit apparu comme initialement attrayant pour l'étude des infections par les virus respiratoires aux temps précoces, il est essentiel de prendre en compte ses limites. Une meilleure compréhension de ce modèle ainsi que des améliorations du système sont nécessaires afin de pouvoir potentiellement l'utiliser en tant que modèle d'infection.

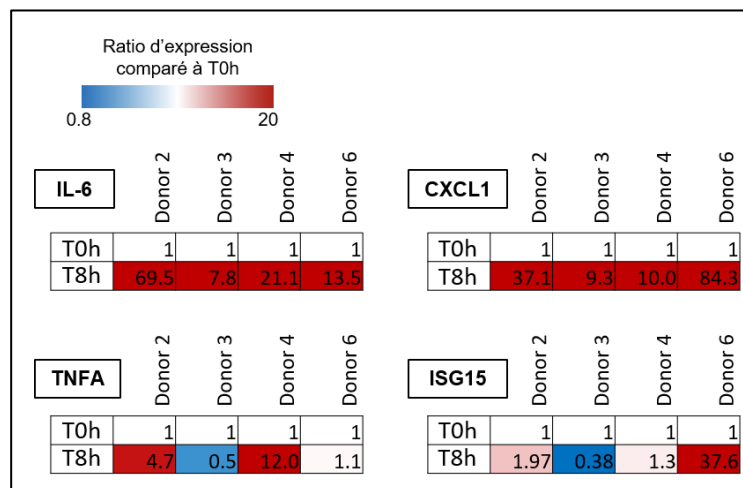


Figure 9. Ratio d'expression de cytokines inflammatoires après remise en culture d'explants pulmonaires : Après 10h sur glace des explants pulmonaires sont remis en culture pendant 8h puis l'expression de cytokines inflammatoires a été réalisée par RTqPCR. La remise en culture simple des explants induit une production forte d'IL-6 et de CXCL1 tandis que pour le TNF et ISG15 cela varie en fonction des donneurs. Le donneur 6 n'a pas été utilisé pour le scRNAseq.

4.2 LES LIMITES DU MODELE D'INFECTION DE CELLULES ISOLEES :

Le second modèle que nous avons utilisé dans le cadre de ma thèse est celui des cellules isolées à partir du poumon. Le micro-environnement dans lequel les cellules se sont différenciées semble impacter fortement les propriétés ainsi que les fonctionnalités des cellules, par exemple des MPs se trouvant au niveau pulmonaire ont des programmes géniques distincts de ceux de l'intestin²¹⁵. Ainsi, l'avantage de notre modèle de cellules isolées est qu'elles sont issues des poumons alors que la plupart des cellules utilisées dans les études du SARS-CoV-2 sont des cellules dérivées *in vitro* à partir du sang ou bien dans quelques papiers des cellules issues de BAL, comme nous l'avons montré dans le tableau 1 de la partie 1.6 de l'introduction. Malgré tout, ce modèle cellulaire présente des limites qu'il faut prendre en compte dans l'analyse des résultats. Lorsque nous isolons les cellules à partir des prélèvements pulmonaires, il est important de considérer que les différentes étapes expérimentales réalisées peuvent activer les cellules et biaiser les résultats observés par la suite. En effet, la dissociation tissulaire, le repos pendant la nuit que j'ai appliqué systématiquement après la dissociation pour des raisons de faisabilité, les différentes étapes de marquage ainsi que le tri réalisé avec le cytomètre trieur sont autant d'étapes qui peuvent influencer sur l'état d'activation des cellules. Tout comme le modèle de poumon entier, l'activation potentielle des cellules par ces étapes peut affecter leur réponse au virus. Une autre limite de ce modèle concerne l'ischémie chaude. Même si nous avons l'opportunité d'aller directement au bloc opératoire afin de récupérer les échantillons, cette durée peut varier d'un prélèvement à l'autre en fonction de la chirurgie. En effet, par rapport au prélèvement sur donneur d'organes en mort encéphalique, la durée d'ischémie chaude est assez importante lors de chirurgie de résection, à cause du processus d'isolement du fragment retiré et de l'hémostase associée. Cependant, nous avons eu la chance de pouvoir travailler rapidement une

fois le prélèvement récupéré, en enchaînant les différentes étapes expérimentales jusqu'au tri des cellules grâce au laboratoire « V2I-Suresnes » et le cytomètre trieur présent sur le même site que celui du bloc opératoire. De plus avec ma responsable, nous sommes devenues autonomes dans la manipulation du trieur, nous permettant de ne pas dépendre d'une plateforme de tri, ce qui nous a donné beaucoup de souplesse. Enfin, il est également important d'avoir à l'esprit que les échantillons prélevés proviennent de patients ayant un cancer pulmonaire. Cela signifie que, bien que le prélèvement réalisé à partir de l'exérèse pulmonaire soit fait le plus loin possible de la tumeur, les cellules analysées proviennent d'un environnement tumoral qui pourrait impacter les résultats. Ainsi, bien que les cellules isolées à partir du poumon soient un modèle plus pertinent que les cellules dérivées *in vitro*, il est nécessaire de garder un œil critique sur l'interprétation des résultats et de reconnaître leurs limites.

4.3 L'IMPLICATION DES MONOCYTES ET MACROPHAGES DANS LES PREMIERES ETAPES DE L'INFECTION

De nombreux travaux montrent que les compartiments des Mos et des MPs sont impactés lors de l'infection par le SARS-CoV-2, cependant leur rôle dans les premières étapes de l'infection sont mal connus. L'étude que nous avons réalisée sur les événements initiaux prenant place suite à l'interaction entre le virus et le poumon humain entier montre que : i) les AMs et les MoMacs sont les principales cibles du SARS-CoV-2 ii) les AMs, les MoMacs, les cMos et les ncMos produisent des cytokines inflammatoires en réponse au virus et iii) les MoMacs sont les plus grands producteurs de cytokines, tandis que les ncMos sont les moins producteurs. Ces résultats se placent dans un contexte de connaissances où le rôle des monocytes/macrophages lors de l'infection virale, en particulier dans la production de cytokines inflammatoires, est controversé. En effet, plusieurs études montrent que l'exposition des monocytes/macrophages au SARS-CoV-2 déclenche la synthèse de cytokines

inflammatoires^{124,127,132}, comme nous l'avons constaté, tandis que d'autres études rapportent le contraire¹³³⁻¹³⁵. L'analyse cytokinique que nous avons réalisée par multiplex repose sur un panel de 12 cytokines que nous avons sélectionné sur la base de la littérature. Du fait de ce panel limité, nous avons pu manquer l'expression de certaines cytokines suite à l'infection, il serait donc intéressant d'étudier un panel plus large afin de voir s'il existe d'autres types de réponses au sein des différentes sous-populations. De plus, nous n'avons pas détecté d'infection productive dans nos différentes sous-populations de Mos et MPs, ce qui va dans le sens de la plupart des études même si quelques-unes montrent l'inverse^{130,131}. Les raisons de ces divergences peuvent être dûes à des biais méthodologiques ou encore à des différences dans l'origine et le type de MPs qui peuvent jouer un rôle dans la réponse obtenue. La plupart des études utilisent des MPs dérivés *in vitro* à partir de Mos qui pourraient donc ne pas avoir les mêmes propriétés fonctionnelles que les MPs et Mos issus du poumon. Des études récentes, utilisant des approches basées sur les tissus pulmonaires, appuient nos résultats. C'est le cas de l'étude d'*Honske et al* qui, avec des explants pulmonaires, a également détecté de l'ARN viral principalement dans les AMs et les MoMacs, et rarement dans d'autres types de cellules, confirmant le tropisme cellulaire que nous avons observé¹²⁶, mais dans leur cas, les rapports spatiaux (anatomiques) n'étaient pas pris en compte.

Nous avons attribué la réponse cytokinique des cellules au virus lui-même. Cependant, nous ne pouvons pas être certains qu'il s'agisse de virus libre ou de virus associé à des corps apoptotiques générés lors de la production virale sur VEROE6. En effet, une étude a montré que la capture de corps apoptotiques provenant de cellules infectées était un mécanisme déterminant dans la réponse des MPs suite à l'infection par le SARS-CoV-2²¹⁶. Cette étude indique aussi que les MPs, une fois activés, vont produire des cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF, mais également participer à

l'activation des pDCs qui à leur tour produisent en grande quantité de l'IFN- α et du TNF²¹⁶. Dans l'infection naturelle, de tels corps apoptotiques pourraient être produits par les voies respiratoires hautes, qui atteindraient ensuite le poumon pour son infection initiale.

Bien que ACE2 soit le récepteur principal du SARS-CoV-2, il existe d'autres récepteurs alternatifs dont nous avons discuté dans le point 2.3.2 de l'introduction. Certains sont exprimés par les macrophages, comme SIGLEC-1, et ils pourraient jouer un rôle crucial dans la dissémination virale. En effet, les MPs en liant le virus pourraient agir tel un « cheval de Troie » en disséminant le virus par trans-infection aux cellules avoisinantes possédant le récepteur ACE2. L'étude de *Lempp et al* a montré que la transfection de cellules Hela avec des vecteurs codant pour certains de ces récepteurs alternatifs (DC-SIGN, L-SIGN et SIGLEC-1) permet la trans-infection virale de cellules VEROE6-TMPRSS2 cibles du virus²¹⁷. Ainsi, il serait intéressant de tester la capacité de trans-infection des MPs et des Mos pulmonaires dans le cas de l'infection par le SARS-CoV-2, car à ma connaissance, cette propriété a aussi été montrée pour des DCs mais pas pour des MPs²¹⁷. Néanmoins, ces cellules pourraient tout simplement jouer leurs rôles de « nettoyeur » en éliminant par phagocytose les cellules infectées, sans participer à la dissémination virale.

En résumé, il reste encore de nombreuses inconnues à explorer afin d'établir un consensus clair concernant les réponses cellulaires, les mécanismes d'activation et les récepteurs impliqués dans la réponse des Mos et MPs en réponse au SARS-CoV-2.

4.4 AMELIORATION DE LA PPEV

Le système de PPEV, bien que permettant le maintien *ex vivo* de l'organe, ne permet pas la filtration et l'épuration des déchets métaboliques dont l'accumulation pourrait impacter négativement l'organe. Ainsi, l'utilisation de membrane de dialyse aurait pu permettre d'améliorer l'état des greffons pendant la PPEV. Une première étude, réalisée au sein de l'équipe pendant 6h de PPEV dans un modèle porcin, avait permis de mettre en évidence que l'ajout de membrane de dialyse adulte ou pédiatrique n'avait pas eu d'effets significatifs sur la fonction pulmonaire ou sur le profil d'expression génique *ex vivo* comparé à la technique GS²¹⁸. La seconde étude, à laquelle j'ai participé pour l'analyse des résultats, s'est concentrée sur la comparaison de la technique GS à l'utilisation d'une membrane de DP pendant 12h de PPEV, toujours dans un modèle porcin. Nous avons ainsi pu montrer que la membrane de DP, bien que permettant un meilleur équilibre dans la composition en électrolytes et métabolites, induit une augmentation dans l'accumulation de cytokines inflammatoires comparé à la technique GS. Nous pensons que cette réponse inflammatoire n'est pas souhaitable, car son intensité est associée au développement de la DPG²¹⁹, elle pourrait activer les APCs et favoriser l'œdème. Toutefois, il est difficile de conclure dans l'état actuel, car le niveau et la composition de la réponse inflammatoire durant la PPEV pourrait être l'élément important associé à l'issue clinique. Nos résultats ne reposent que sur l'analyse de données physiologiques, métaboliques et génomiques durant la PPEV seule, il faudrait transplanter ces poumons en fin de procédure pour pouvoir comparer et mieux estimer l'impact clinique des deux techniques sur le devenir des greffons en post-transplantation.

Une autre voie d'amélioration de la PPEV pourrait concerner la ventilation. En physiologie, la ventilation spontanée est permise par une pression négative intrathoracique générée par les muscles respiratoires. A l'inverse, la ventilation

artificielle utilisée pendant la réanimation ou la PPEV se fait au moyen de l'application d'une pression positive. Des études ont montré que cette ventilation en pression positive, dans des conditions extrêmes, pouvait induire à elle seule un œdème pulmonaire léthal, principalement par des lésions de la barrière alvéolocapillaire, qui peuvent générer une inflammation locale avec une augmentation de l'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8 et du TNF- α ^{220,221}. Il est possible que l'inflammation que nous avons observée dans les points 3.1 et 3.3 des résultats de la thèse résulte, pour partie, de cette application de pression positive ventilatoire. En effet, une étude réalisée dans un modèle porcin a permis de mettre en évidence que l'utilisation de la ventilation en pression négative permet de diminuer de manière significative l'inflammation et la blessure tissulaire induite pendant la PPEV²²². Ainsi, l'application d'une ventilation en pression négative pendant la PPEV pourrait permettre de diminuer le risque de survenue d'œdème, notamment quand elle est prolongée.

La composition intrinsèque du liquide de perfusion pourrait également être un point d'amélioration du système. En effet, une étude réalisée dans un modèle porcin a montré que l'ajout de glutamine dans le liquide de perfusion de la PPEV permet d'améliorer la fonction pulmonaire de l'organe²²³. Une autre étude, cette fois réalisée dans un modèle rat et dans un contexte de perfusion *ex vivo* hépatique, a montré que l'ajout de glycine permet d'améliorer la préservation de l'intégrité de l'organe en fin de procédure²²⁴. Enfin, l'ajout de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) pourrait également être un bon moyen d'amélioration de la PPEV. En effet, l'administration de ces cellules possédant des propriétés anti-inflammatoires, d'immunomodulation ainsi que de réparation tissulaire pourrait être une approche intéressante. Plusieurs études, administrant des MSCs pendant la PPEV ont observé une baisse du niveau de cytokines inflammatoires induites, ainsi qu'une réduction des lésions tissulaires induites par l'ischémie reperfusion au cours de la procédure^{201,225,226}.

Ainsi, la PPEV, bien que déjà utilisée en clinique, pourrait être améliorée afin d'élargir les critères de prélèvement permettant ainsi d'augmenter le pool de greffons disponible tout en réduisant le risque de survenue de la DPG. Son optimisation est donc un enjeu majeur, et passe par de l'innovation dans la conduite de la technique ainsi que par l'amélioration de la compréhension des mécanismes lésionnels impliqués.

4.5 LES LIMITES DU SCRNA-SEQ

Afin d'analyser le transcriptome cellulaire de nos échantillons, nous avons réalisé des analyses par scRNA-seq nous permettant d'obtenir les profils d'expression ARNm à l'échelle de la cellule. Cette technique de séquençage puissante présente toutefois des limites techniques dont nous allons discuter.

Tout d'abord, une première limite réside dans le nombre maximal de cellules pouvant être analysées. Lors de notre étude, nous avons réalisé les analyses scRNA-seq avec la méthode de microfluidique de 10XGenomics. Cette méthode permet de réaliser l'analyse du transcriptome de 20 000 cellules au maximum. Cette contrainte technique dans le nombre de cellules crée un biais. En effet, les cellules isolées proviennent d'un fragment pulmonaire prélevé à partir de notre modèle poumon entier, qui est composé d'environ 10^{11} cellules. Ainsi, les résultats sont probablement affectés par l'échantillonnage initial de tissus pulmonaire dans un site donné et par le nombre restreint de cellules analysées (soit environ une cellule sur cinq million de cellules totales du poumon). De plus, les populations cellulaires rares ont peu de chance d'être représentées en nombre suffisant pour permettre une analyse biostatistique. Il faut donc prendre en compte cette contrainte lors de l'analyse de nos résultats.

Ensuite, la profondeur de séquençage du scRNA-seq est une limite à prendre en compte. Afin qu'un gène soit détecté dans une cellule suite au séquençage il faut que celui-ci soit représenté par 100 à 1000 copies²²⁷. Cette sensibilité dans la détection pourrait expliquer, du moins en partie, le faible nombre de cellules positives pour le SARS-CoV-2 que nous avons détectées dans le point 3.2 des résultats, avec seulement 27 cellules positives dont l'identité a pu être établie, avec un score satisfaisant, que pour 23 d'entre elles par Azimuth. La limite du nombre de copies d'ARNm par cellule conduit à ce qui est appelé des « drop-outs » dans le langage du scRNA-seq : ainsi un gène peut être détecté dans une cellule et pas dans une autre alors qu'elles sont du même type cellulaire. Ces limites techniques, dues à la profondeur du séquençage et donc à son coût, nécessitent d'être prises en compte dans l'analyse des données et dans l'interprétation des résultats, car elles peuvent influencer la détection de la présence de certains gènes.

La collaboration avec des bio-informaticiens a été essentielle pour analyser les données de séquençage, elle fut très riche mais elle n'a pas été sans défis. La mise au point progressive de la méthode d'identification cellulaire a demandé beaucoup de temps, avec des réunions régulières conduisant, la plupart du temps, à tester différentes approches, et à refaire maintes fois nos analyses de signification biologique dans la foulée pour assurer une dynamique positive dans le groupe. De plus, les méthodes d'analyse bio-statistiques pour l'identification cellulaire ne sont pas encore établies et varient entre les laboratoires. Ainsi, la soumission initiale de notre premier article présenté dans le point 3.1 des résultats utilisait le logiciel Bubblegum, qui est la technique d'identification classiquement utilisée par nos collaborateurs (analyse statistique de similarité avec des signatures de référence, basée sur l'approche GSEA). Les remarques émises par l'un des reviewers nous ont engagés à utiliser la méthode

d'identification Azimuth ainsi qu'à modifier le mode de filtration de nos données et à ré-ajuster le clustering. Cela a nécessité que nous reprenions l'analyse de nos datas depuis le début, notamment les analyses de génomique fonctionnelle de tous les types cellulaires analysés, ce qui fut un immense travail à réaliser dans le temps imparti par l'éditeur. Toutefois, cette nouvelle approche a fortement enrichi nos conclusions. Cette expérience nous a montré qu'un même jeu de données peut être analysé de plusieurs manières conduisant à des interprétations biologiques plus ou moins poussées et intéressantes.

Enfin, il est important de noter que lors de nos analyses de génomique fonctionnelle, nous avons utilisé des seuils plus ou moins arbitraires (p-values, z-scores). Bien que certains des seuils sont définis sur la base des recommandations des développeurs (IPA, GSEA), nous avons choisi l'ensemble des seuils de manière à obtenir des résultats solides et pertinents, en tenant compte des gènes contributeurs des fonctions et réseaux de signalisation enrichis ou prédits activés/inhibés. La pertinence des gènes contributeurs est déduite par nos connaissances appuyées, le plus souvent par des bases de données telles que GeneCard et PubMed, ce qui conduit à énormément de recherches « à la main ». Cependant, il est important de reconnaître que les seuils arbitraires utilisés ont pu affecter certaines conclusions.

En conclusion, le scRNA-seq est une approche puissante qui permet d'obtenir des informations sur les réponses biologiques au niveau des différents types cellulaires. Il faut toutefois prendre en compte les différentes limites dues à la technique lors de l'interprétation des résultats. Enfin, il est important d'assortir les résultats d'autres analyses biométriques, notamment protéiques.

5 BIBLIOGRAPHIE :

1. Timeline: WHO's COVID-19 response.
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/interactive-timeline>.
2. Roux, J., Massonnaud, C. & Crépey, P. *COVID-19: One-month impact of the French lockdown on the epidemic burden*.
<http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.04.22.20075705> (2020)
doi:10.1101/2020.04.22.20075705.
3. Fu, Y.-Z. *et al.* SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 613–620 (2021).
4. Walls, A. C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* **181**, 281-292.e6 (2020).
5. Won, J. *et al.* Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp. Neurobiol.* **29**, 107–119 (2020).
6. Liu, W. *et al.* Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibodies against SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.* **58**, e00461-20 (2020).
7. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).
8. Chan, J. F.-W. *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic

- coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 221–236 (2020).
9. Gordon, D. E. *et al.* Comparative host-coronavirus protein interaction networks reveal pan-viral disease mechanisms. *Science* **370**, eabe9403 (2020).
 10. Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet Lond. Engl.* **395**, 565–574 (2020).
 11. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pöhlmann, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol. Cell* **78**, 779-784.e5 (2020).
 12. Shang, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 11727–11734 (2020).
 13. Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N. & Siddique, R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J. Adv. Res.* **24**, 91–98 (2020).
 14. Klein, S. *et al.* SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat. Commun.* **11**, 5885 (2020).
 15. Lebeau, G. *et al.* Deciphering SARS-CoV-2 Virologic and Immunologic Features. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5932 (2020).
 16. Harrison, A. G., Lin, T. & Wang, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* **41**, 1100–1115 (2020).

17. Duffy, S., Shackelton, L. A. & Holmes, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 267–276 (2008).
18. Gellenoncourt, S. *et al.* The Spike-Stabilizing D614G Mutation Interacts with S1/S2 Cleavage Site Mutations To Promote the Infectious Potential of SARS-CoV-2 Variants. *J. Virol.* **96**, e0130122 (2022).
19. Zhou, B. *et al.* SARS-CoV-2 spike D614G change enhances replication and transmission. *Nature* **592**, 122–127 (2021).
20. Korber, B. *et al.* Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell* **182**, 812–827.e19 (2020).
21. Rajah, M. M. *et al.* SARS-CoV-2 Alpha, Beta, and Delta variants display enhanced Spike-mediated syncytia formation. *EMBO J.* **40**, e108944 (2021).
22. Lista, M. J. *et al.* The P681H Mutation in the Spike Glycoprotein of the Alpha Variant of SARS-CoV-2 Escapes IFITM Restriction and Is Necessary for Type I Interferon Resistance. *J. Virol.* **0**, e01250-22 (2022).
23. Thorne, L. G. *et al.* Evolution of enhanced innate immune evasion by SARS-CoV-2. *Nature* **602**, 487–495 (2022).
24. Planas, D. *et al.* Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **27**, 917–924 (2021).
25. Zhou, D. *et al.* Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell* **184**, 2348–2361.e6 (2021).
26. Planas, D. *et al.* Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody

- neutralization. *Nature* **596**, 276–280 (2021).
27. Sanches, P. R. S. *et al.* Recent advances in SARS-CoV-2 Spike protein and RBD mutations comparison between new variants Alpha (B.1.1.7, United Kingdom), Beta (B.1.351, South Africa), Gamma (P.1, Brazil) and Delta (B.1.617.2, India). *J. Virus Erad.* **7**, 100054 (2021).
 28. Sharma, P. *et al.* Genomic and structural mechanistic insight to reveal the differential infectivity of omicron and other variants of concern. *Comput. Biol. Med.* **150**, 106129 (2022).
 29. Twohig, K. A. *et al.* Hospital admission and emergency care attendance risk for SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) compared with alpha (B.1.1.7) variants of concern: a cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **22**, 35–42 (2022).
 30. Suzuki, R. *et al.* Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature* **603**, 700–705 (2022).
 31. Liu, J. *et al.* SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. *Cell Discov.* **7**, 1–4 (2021).
 32. Puelles, V. G. *et al.* Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* NEJMc2011400 (2020) doi:10.1056/NEJMc2011400.
 33. Fiege, J. K. *et al.* Single cell resolution of SARS-CoV-2 tropism, antiviral responses, and susceptibility to therapies in primary human airway epithelium. *PLOS Pathog.* **17**, e1009292 (2021).
 34. Ramos da Silva, S. *et al.* Broad Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

- Cell Tropism and Immunopathology in Lung Tissues From Fatal Coronavirus Disease 2019. *J. Infect. Dis.* **223**, 1842–1854 (2021).
35. Schwab, C. *et al.* Cell tropism and viral clearance during SARS-CoV-2 lung infection. *Pathol. - Res. Pract.* **236**, 154000 (2022).
 36. Varga, Z. *et al.* Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet* **395**, 1417–1418 (2020).
 37. Wong, D. W. L. *et al.* Multisystemic Cellular Tropism of SARS-CoV-2 in Autopsies of COVID-19 Patients. *Cells* **10**, 1900 (2021).
 38. Ashraf, U. M. *et al.* SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion. *Physiol. Genomics* **53**, 51–60 (2021).
 39. Hou, Y. J. *et al.* SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell* **182**, 429–446.e14 (2020).
 40. Sungnak, W. *et al.* SARS-CoV-2 Entry Factors are Highly Expressed in Nasal Epithelial Cells Together with Innate Immune Genes. *Nat. Med.* **26**, 681–687 (2020).
 41. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pöhlmann, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Mol. Cell* **78**, 779–784.e5 (2020).
 42. Essalmani, R. *et al.* Distinctive Roles of Furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infectivity. *J. Virol.* **96**, e00128-22 (2022).
 43. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B. & Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 3–20 (2022).

44. Jalloh, S. *et al.* CD169-mediated restrictive SARS-CoV-2 infection of macrophages induces pro-inflammatory responses. *PLoS Pathog.* **18**, e1010479 (2022).
45. Perez-Zsolt, D. *et al.* SARS-CoV-2 interaction with Siglec-1 mediates trans-infection by dendritic cells. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 2676–2678 (2021).
46. Lempp, F. A. *et al.* Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature* **598**, 342–347 (2021).
47. Amraei, R. *et al.* CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN Act as Receptors for SARS-CoV-2. *ACS Cent. Sci.* **7**, 1156–1165 (2021).
48. Thépaut, M. *et al.* DC/L-SIGN recognition of spike glycoprotein promotes SARS-CoV-2 trans-infection and can be inhibited by a glycomimetic antagonist. *PLoS Pathog.* **17**, e1009576 (2021).
49. Guo, L. *et al.* Epigenetic glycosylation of SARS-CoV-2 impact viral infection through DC&L-SIGN receptors. *iScience* **24**, 103426 (2021).
50. Ankerhold, J. *et al.* S1Enhanced FcγRIII/CD16 activation by discrete ligands as independent correlates of disease severity in COVID-19 patients. 2021.06.25.449893 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2021.06.25.449893> (2021).
51. Junqueira, C. *et al.* FcγR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature* **606**, 576–584 (2022).
52. Mayi, B. S. *et al.* The role of Neuropilin-1 in COVID-19. *PLoS Pathog.* **17**, e1009153 (2021).
53. Roy, S. *et al.* Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential

- Targets for Immunotherapy. *Front. Immunol.* **8**, 1228 (2017).
54. Guo, H.-F. & Vander Kooi, C. W. Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *J. Biol. Chem.* **290**, 29120–29126 (2015).
 55. van der Sluis, R. M. *et al.* TLR2 and TLR7 mediate distinct immunopathological and antiviral plasmacytoid dendritic cell responses to SARS-CoV-2 infection. *EMBO J.* **41**, e109622 (2022).
 56. Daly, J. L. *et al.* Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* **370**, 861–865 (2020).
 57. Cantuti-Castelvetri, L. *et al.* Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* **370**, 856–860 (2020).
 58. Shilts, J. *et al.* LRRC15 mediates an accessory interaction with the SARS-CoV-2 spike protein. *PLoS Biol.* **21**, e3001959 (2023).
 59. Loo, L. *et al.* Fibroblast-expressed LRRC15 is a receptor for SARS-CoV-2 spike and controls antiviral and antifibrotic transcriptional programs. *PLOS Biol.* **21**, e3001967 (2023).
 60. Alipoor, S. D. & Mirsaiedi, M. SARS-CoV-2 cell entry beyond the ACE2 receptor. *Mol. Biol. Rep.* **49**, 10715–10727 (2022).
 61. Pushkarsky, T. *et al.* CD147 facilitates HIV-1 infection by interacting with virus-associated cyclophilin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6360–6365 (2001).
 62. Chen, Z. *et al.* Function of HAb18G/CD147 in Invasion of Host Cells by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Infect. Dis.* **191**, 755–760 (2005).

63. Wang, K. *et al.* CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 283 (2020).
64. Helal, M. A. *et al.* Molecular basis of the potential interaction of SARS-CoV-2 spike protein to CD147 in COVID-19 associated-lymphopenia. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1–11 doi:10.1080/07391102.2020.1822208.
65. Shilts, J., Crozier, T. W. M., Greenwood, E. J. D., Lehner, P. J. & Wright, G. J. No evidence for basigin/CD147 as a direct SARS-CoV-2 spike binding receptor. *Sci. Rep.* **11**, 413 (2021).
66. Mehta, O. P., Bhandari, P., Raut, A., Kacimi, S. E. O. & Huy, N. T. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. *Front. Public Health* **8**, 582932 (2021).
67. Acter, T. *et al.* Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A global health emergency. *Sci. Total Environ.* **730**, 138996 (2020).
68. Ma, Q. *et al.* Global Percentage of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infections Among the Tested Population and Individuals With Confirmed COVID-19 Diagnosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw. Open* **4**, e2137257 (2021).
69. Lauer, S. A. *et al.* The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann. Intern. Med.* M20-0504 (2020) doi:10.7326/M20-0504.
70. Ochani, R. K. *et al.* COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A

comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management.

71. Chilamakuri, R. & Agarwal, S. COVID-19: Characteristics and Therapeutics. *Cells* **10**, 206 (2021).
72. Hu, B., Guo, H., Zhou, P. & Shi, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 141–154 (2021).
73. Elrobaa, I. H. & New, K. J. COVID-19: Pulmonary and Extra Pulmonary Manifestations. *Front. Public Health* **9**, 711616 (2021).
74. Chen, N. *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet Lond. Engl.* **395**, 507–513 (2020).
75. Tian, S. *et al.* Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod. Pathol.* **33**, 1007–1014 (2020).
76. Falck-Jones, S., Österberg, B. & Smed-Sörensen, A. Respiratory and systemic monocytes, dendritic cells, and myeloid-derived suppressor cells in COVID-19: Implications for disease severity. *J. Intern. Med.* 10.1111/joim.13559 (2022) doi:10.1111/joim.13559.
77. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison | Nature Immunology. <https://www.nature.com/articles/s41590-020-00840-x>.
78. Hadjadj, J. *et al.* Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in

- severe COVID-19 patients. *Science* **369**, 718–724 (2020).
79. Blanco-Melo, D. *et al.* Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell* **181**, 1036–1045.e9 (2020).
80. Bastard, P. *et al.* Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* **370**, eabd4585 (2020).
81. Minkoff, J. M. & tenOever, B. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **21**, 178–194 (2023).
82. Rashid, F. *et al.* Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. *Front. Immunol.* **13**, 940756 (2022).
83. Yin, X. *et al.* MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep.* **34**, 108628 (2021).
84. Oh, S.-J. & Shin, O. S. SARS-CoV-2-mediated evasion strategies for antiviral interferon pathways. *J. Microbiol. Seoul Korea* **60**, 290–299 (2022).
85. Zheng, Y. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) membrane (M) protein inhibits type I and III interferon production by targeting RIG-I/MDA-5 signaling. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 299 (2020).
86. Zhao, Y. *et al.* A dual-role of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in regulating innate immune response. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 331 (2021).
87. Kim, Y.-M. & Shin, E.-C. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp. Mol. Med.* **53**, 750–760 (2021).
88. Bain, C. C., Rossi, A. G. & Lucas, C. D. Pulmonary macrophages and SARS-Cov2

- infection. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **367**, 1–28 (2022).
89. Rodrigues, P. R. S. *et al.* Innate immunology in COVID-19—a living review. Part II: dysregulated inflammation drives immunopathology. *Oxf. Open Immunol.* **1**, iqaa005 (2020).
90. Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation | Signal Transduction and Targeted Therapy. <https://www.nature.com/articles/s41392-022-01133-5>.
91. Cugno, M. *et al.* Complement activation in patients with COVID-19: A novel therapeutic target. *J. Allergy Clin. Immunol.* **146**, 215–217 (2020).
92. Pinto, D. *et al.* Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature* **583**, 290–295 (2020).
93. Zhao, X.-N. *et al.* Single-cell immune profiling reveals distinct immune response in asymptomatic COVID-19 patients. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 1–11 (2021).
94. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I | PNAS. <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2024202118>.
95. Chua, R. L. *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat. Biotechnol.* **38**, 970–979 (2020).
96. Maucourant, C. *et al.* Natural killer cell immunotypes related to COVID-19 disease severity. *Sci. Immunol.* **5**, eabd6832 (2020).
97. Demaria, O. *et al.* Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on

- Natural Killer cells in COVID-19. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 995–997 (2020).
98. Zheng, M. *et al.* Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 533–535 (2020).
99. DiPiazza, A. T., Graham, B. S. & Ruckwardt, T. J. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **538**, 211–217 (2021).
100. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7987233/>.
101. Weiskopf, D. *et al.* Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Sci. Immunol.* **5**, eabd2071 (2020).
102. Tomar, B., Anders, H.-J., Desai, J. & Mulay, S. R. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells* **9**, 1383 (2020).
103. Evren, E., Ringqvist, E. & Willinger, T. Origin and ontogeny of lung macrophages: from mice to humans. *Immunology* **160**, 126–138 (2020).
104. Blériot, C., Chakarov, S. & Ginhoux, F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* **52**, 957–970 (2020).
105. Bharat, A. *et al.* Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **54**, 147–149 (2016).
106. Hume, P. S. *et al.* Localization of Macrophages in the Human Lung via Design-based Stereology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **201**, 1209–1217 (2020).

107. Allard, B., Panariti, A. & Martin, J. G. Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection. *Front. Immunol.* **9**, 1777 (2018).
108. Lee, Y. G. *et al.* Recruited Alveolar Macrophages, in Response to Airway Epithelial-Derived Monocyte Chemoattractant Protein 1/CCL2, Regulate Airway Inflammation and Remodeling in Allergic Asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **52**, 772–784 (2015).
109. Misharin, A. V. *et al.* Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J. Exp. Med.* **214**, 2387–2404 (2017).
110. Naessens, T. *et al.* Innate Imprinting of Murine Resident Alveolar Macrophages by Allergic Bronchial Inflammation Causes a Switch from Hypoinflammatory to Hyperinflammatory Reactivity. *Am. J. Pathol.* **181**, 174–184 (2012).
111. Guilliams, M., Mildner, A. & Yona, S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* **49**, 595–613 (2018).
112. Mulder, K. *et al.* Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity* **54**, 1883-1900.e5 (2021).
113. Wong, K. L. *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16–e31 (2011).
114. Shi, T., Denney, L., An, H., Ho, L.-P. & Zheng, Y. Alveolar and lung interstitial macrophages: Definitions, functions, and roles in lung fibrosis. *J. Leukoc. Biol.* **110**,

- 107–114 (2021).
115. Heinen, N., Klöhn, M., Steinmann, E. & Pfaender, S. In Vitro Lung Models and Their Application to Study SARS-CoV-2 Pathogenesis and Disease. *Viruses* **13**, 792 (2021).
116. Gibbings, S. L. *et al.* Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **57**, 66–76 (2017).
117. Tang, X.-Z., Kreuk, L. S. M., Cho, C., Metzger, R. J. & Allen, C. D. C. Bronchus-associated macrophages efficiently capture and present soluble inhaled antigens and are capable of local Th2 cell activation. *eLife* **11**, e63296.
118. Chakarov, S. *et al.* Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science* **363**, eaau0964 (2019).
119. Sabatel, C. *et al.* Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* **46**, 457–473 (2017).
120. Morales-Nebreda, L., Misharin, A. V., Perlman, H. & Budinger, G. R. S. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *Eur. Respir. Rev.* **24**, 505–509 (2015).
121. Hoeffel, G. & Ginhoux, F. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front. Immunol.* **6**, 486 (2015).
122. Ren, X. *et al.* COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas. *Cell* **184**, 1895–1913.e19 (2021).

123. Delorey, T. M. *et al.* COVID-19 tissue atlases reveal SARS-CoV-2 pathology and cellular targets. *Nature* **595**, 107–113 (2021).
124. Boumaza, A. *et al.* Monocytes and macrophages, targets of SARS-CoV-2: the clue for Covid-19 immunoparalysis. *J. Infect. Dis.* jiab044 (2021) doi:10.1093/infdis/jiab044.
125. Lu, Q. *et al.* SARS-CoV-2 exacerbates proinflammatory responses in myeloid cells through C-type lectin receptors and Tweety family member 2. *Immunity* **54**, 1304-1319.e9 (2021).
126. Hönzke, K. *et al.* Human lungs show limited permissiveness for SARS-CoV-2 due to scarce ACE2 levels but virus-induced expansion of inflammatory macrophages. *Eur. Respir. J.* **60**, 2102725 (2022).
127. Zheng, J. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Induced Immune Activation and Death of Monocyte-Derived Human Macrophages and Dendritic Cells. *J. Infect. Dis.* **223**, 785–795 (2020).
128. García-Nicolás, O. *et al.* No Evidence for Human Monocyte-Derived Macrophage Infection and Antibody-Mediated Enhancement of SARS-CoV-2 Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 644574 (2021).
129. Sefik, E. *et al.* Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature* **606**, 585–593 (2022).
130. Wang, Z. *et al.* Escaping alveolar macrophage endosomal retention explains massive expansion of SARS-CoV-2 delta variant. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**,

(2021).

131. Magnen, M. *et al.* Immediate myeloid depot for SARS-CoV-2 in the human lung. *bioRxiv* 2022.04.28.489942 (2022) doi:10.1101/2022.04.28.489942.
132. Abdelmoaty, M. M. *et al.* Defining the Innate Immune Responses for SARS-CoV-2-Human Macrophage Interactions. *Front. Immunol.* **12**, 741502 (2021).
133. Labzin, L. I. *et al.* Macrophage ACE2 is necessary for SARS-CoV-2 replication and subsequent cytokine responses that restrict continued virion release. *Sci. Signal.* **16**, eabq1366 (2023).
134. Zhang, Z., Penn, R., Barclay, W. S. & Giotis, E. S. Naïve Human Macrophages Are Refractory to SARS-CoV-2 Infection and Exhibit a Modest Inflammatory Response Early in Infection. *Viruses* **14**, 441 (2022).
135. Niles, M. A. *et al.* Macrophages and Dendritic Cells Are Not the Major Source of Pro-Inflammatory Cytokines Upon SARS-CoV-2 Infection. *Front. Immunol.* **12**, 647824 (2021).
136. Giamarellos-Bourboulis, E. J. *et al.* Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. *Cell Host Microbe* **27**, 992-1000.e3 (2020).
137. Schulte-Schrepping, J. *et al.* Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. *Cell* **182**, 1419-1440.e23 (2020).
138. Sanchez-Cerrillo, I. *et al.* Differential Redistribution of Activated Monocyte and Dendritic Cell Subsets to the Lung Associates with Severity of COVID-19. *medRxiv* 2020.05.13.20100925 (2020) doi:10.1101/2020.05.13.20100925.

139. Wang, C. *et al.* Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. *EBioMedicine* **57**, 102833 (2020).
140. Codo, A. C. *et al.* Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metab.* **32**, 437-446.e5 (2020).
141. Bao, L. *et al.* The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature* **583**, 830–833 (2020).
142. Zheng, J. *et al.* COVID-19 Treatments and Pathogenesis Including Anosmia in K18-hACE2 mice. *Nature* **589**, 603–607 (2021).
143. Sun, R. *et al.* Humanized mice for investigating SARS-CoV-2 lung infection and associated human immune responses. *Eur. J. Immunol.* 10.1002/eji.202249804 (2022) doi:10.1002/eji.202249804.
144. Hansen, J. *et al.* Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science* **369**, 1010–1014 (2020).
145. Munster, V. J. *et al.* Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature* **585**, 268–272 (2020).
146. Singh, D. K. *et al.* Responses to acute infection with SARS-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets. *Nat. Microbiol.* **6**, 73–86 (2021).
147. Kim, Y.-I. *et al.* Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. *Cell Host Microbe* **27**, 704-709.e2 (2020).
148. Ryan, K. A. *et al.* Dose-dependent response to infection with SARS-CoV-2 in the

- ferret model and evidence of protective immunity. *Nat. Commun.* **12**, 81 (2021).
149. Sia, S. F. *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Nature* **583**, 834–838 (2020).
150. Yang, S.-J. *et al.* Characterization of Virus Replication, Pathogenesis, and Cytokine Responses in Syrian Hamsters Inoculated with SARS-CoV-2. *J. Inflamm. Res.* **14**, 3781–3795 (2021).
151. Upadhyay, A. A. *et al.* TREM2+ and interstitial-like macrophages orchestrate airway inflammation in SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques. *Nat. Commun.* **14**, 1914 (2023).
152. Killingley, B. *et al.* Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat. Med.* **28**, 1031–1041 (2022).
153. Chen, Y.-W. *et al.* A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol.* **19**, 542–549 (2017).
154. Takasato, M. *et al.* Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* **526**, 564–568 (2015).
155. Spence, J. R. *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* **470**, 105–109 (2011).
156. Lancaster, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373–379 (2013).
157. Viana, F., O’Kane, C. M. & Schroeder, G. N. Precision-cut lung slices: A powerful ex vivo model to investigate respiratory infectious diseases. *Mol. Microbiol.* **117**, 578–

- 588 (2022).
158. Van Slambrouck, J. *et al.* Visualising SARS-CoV-2 infection of the lung in deceased COVID-19 patients. *eBioMedicine* **92**, 104608 (2023).
159. Diamond, M. S. & Kanneganti, T.-D. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.* **23**, 165–176 (2022).
160. Mantovani, S., Oliviero, B., Varchetta, S., Renieri, A. & Mondelli, M. U. TLRs: Innate Immune Sentries against SARS-CoV-2 Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 8065 (2023).
161. Zheng, M. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **22**, 829–838 (2021).
162. Laurent, P. *et al.* Sensing of SARS-CoV-2 by pDCs and their subsequent production of IFN-I contribute to macrophage-induced cytokine storm during COVID-19. *Sci. Immunol.* **7**, eadd4906 (2022).
163. Bortolotti, D. *et al.* TLR3 and TLR7 RNA Sensor Activation during SARS-CoV-2 Infection. *Microorganisms* **9**, 1820 (2021).
164. Matuozzo, D. *et al.* Rare predicted loss-of-function variants of type I IFN immunity genes are associated with life-threatening COVID-19. *Genome Med.* **15**, 22 (2023).
165. Choudhury, A. & Mukherjee, S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J. Med. Virol.* **92**, 2105–2113 (2020).
166. Thorne, L. G. *et al.* SARS-CoV-2 sensing by RIG-I and MDA5 links epithelial infection to macrophage inflammation. *EMBO J.* **40**, e107826 (2021).

167. Sampaio, N. G. *et al.* The RNA sensor MDA5 detects SARS-CoV-2 infection. *Sci. Rep.* **11**, 13638 (2021).
168. Rebendenne, A. *et al.* SARS-CoV-2 Triggers an MDA-5-Dependent Interferon Response Which Is Unable To Control Replication in Lung Epithelial Cells. *J. Virol.* **95**, e02415-20 (2021).
169. Pan, P. *et al.* SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nat. Commun.* **12**, 4664 (2021).
170. Theobald, S. J. *et al.* Long-lived macrophage reprogramming drives spike protein-mediated inflammasome activation in COVID-19. *EMBO Mol. Med.* **13**, e14150 (2021).
171. Ferreira, A. C. *et al.* SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. *Cell Death Discov.* **7**, 43 (2021).
172. Wu, K. E., Fazal, F. M., Parker, K. R., Zou, J. & Chang, H. Y. RNA-GPS Predicts SARS-CoV-2 RNA Residency to Host Mitochondria and Nucleolus. *Cell Syst.* **11**, 102-108.e3 (2020).
173. Singh, K. K., Chaubey, G., Chen, J. Y. & Suravajhala, P. Decoding SARS-CoV-2 hijacking of host mitochondria in COVID-19 pathogenesis. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **319**, C258–C267 (2020).
174. Zhou, Z. *et al.* Sensing of cytoplasmic chromatin by cGAS activates innate immune response in SARS-CoV-2 infection. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 382 (2021).
175. Rui, Y. *et al.* Unique and complementary suppression of cGAS-STING and RNA

- sensing- triggered innate immune responses by SARS-CoV-2 proteins. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, 123 (2021).
176. Punch, J. D., Hayes, D. H., LaPorte, F. B., McBride, V. & Seely, M. S. Organ Donation and Utilization in the United States, 1996–2005. *Am. J. Transplant.* **7**, 1327–1338 (2007).
177. Tian, D. *et al.* Outcomes of marginal donors for lung transplantation after ex vivo lung perfusion: A systematic review and meta-analysis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **159**, 720-730.e6 (2020).
178. Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2017. <https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2017/donnees/organes/04-coeur-poumon/synthese.htm>.
179. Steen, S. *et al.* Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet Lond. Engl.* **357**, 825–829 (2001).
180. Cypel, M. & Keshavjee, S. Ex Vivo Lung Perfusion. *Oper. Tech. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **19**, 433–442 (2014).
181. Possoz, J., Neyrinck, A. & Van Raemdonck, D. Ex vivo lung perfusion prior to transplantation: an overview of current clinical practice worldwide. *J. Thorac. Dis.* **11**, 1635–1650 (2019).
182. Murala, J. S. *et al.* Ex vivo lung perfusion: how we do it. *Indian J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **37**, 433–444 (2021).
183. Valenza, F. *et al.* Ex vivo lung perfusion to improve donor lung function and

- increase the number of organs available for transplantation. *Transpl. Int.* **27**, 553–561 (2014).
184. Boffini, M. *et al.* Incidence and severity of primary graft dysfunction after lung transplantation using rejected grafts reconditioned with ex vivo lung perfusion. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **46**, 789–793 (2014).
185. Slama, A. *et al.* Standard donor lung procurement with normothermic ex vivo lung perfusion: A prospective randomized clinical trial. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **36**, 744–753 (2017).
186. Cypel, M. *et al.* Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **9**, 2262–2269 (2009).
187. Aigner, C. *et al.* Clinical Ex Vivo Lung Perfusion—Pushing the Limits. *Am. J. Transplant.* **12**, 1839–1847 (2012).
188. Sage, E. *et al.* Lung transplantation from initially rejected donors after ex vivo lung reconditioning: the French experience†. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **46**, 794–799 (2014).
189. Watanabe, T., Cypel, M. & Keshavjee, S. Ex vivo lung perfusion. *J. Thorac. Dis.* **13**, 6602–6617 (2021).
190. Erasmus, M. E., Fernhout, M. H., Elstrodt, J. M. & Rakhorst, G. Normothermic ex vivo lung perfusion of non-heart-beating donor lungs in pigs: from pretransplant

- function analysis towards a 6-h machine preservation. *Transpl. Int.* **19**, 589–593 (2006).
191. Iskender, I. *et al.* Cytokine filtration modulates pulmonary metabolism and edema formation during ex vivo lung perfusion. *J. Heart Lung Transplant.* **37**, 283–291 (2018).
192. Sadaria, M. R. *et al.* Cytokine Expression Profile in Human Lungs Undergoing Normothermic Ex-Vivo Lung Perfusion. *Ann. Thorac. Surg.* **92**, 478–484 (2011).
193. Yeung, J. C. *et al.* Towards donor lung recovery—gene expression changes during ex vivo lung perfusion of human lungs. *Am. J. Transplant.* **18**, 1518–1526 (2018).
194. Pan, X., Yang, J., Fu, S. & Zhao, H. Application of ex vivo lung perfusion (EVLP) in lung transplantation. *J. Thorac. Dis.* **10**, 4637–4642 (2018).
195. den Hengst, W. A. *et al.* Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **299**, H1283–H1299 (2010).
196. Emaminia, A. *et al.* Adenosine A2A Agonist Improves Lung Function During Ex-vivo Lung Perfusion. *Ann. Thorac. Surg.* **92**, 1840–1846 (2011).
197. Wang, X. *et al.* Pharmacological Reconditioning of Marginal Donor Rat Lungs Using Inhibitors of Peroxynitrite and Poly (ADP-ribose) Polymerase During Ex Vivo Lung Perfusion. *Transplantation* **100**, 1465 (2016).
198. Lin, H. *et al.* α 1-Anti-trypsin improves function of porcine donor lungs during ex-vivo lung perfusion. *J. Heart Lung Transplant.* **37**, 656–666 (2018).

199. Nasir, B. S. *et al.* HSP90 Inhibitor Improves Lung Protection in Porcine Model of Donation After Circulatory Arrest. *Ann. Thorac. Surg.* **110**, 1861–1868 (2020).
200. Mesaki, K. *et al.* Immunomodulation of the donor lung with CRISPR-mediated activation of IL-10 expression. *J. Heart Lung Transplant.* (2023) doi:10.1016/j.healun.2023.06.001.
201. Martens, A. *et al.* Immunoregulatory effects of multipotent adult progenitor cells in a porcine ex vivo lung perfusion model. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, (2017).
202. Wang, A., Ali, A., Keshavjee, S., Liu, M. & Cypel, M. Ex vivo lung perfusion for donor lung assessment and repair: a review of translational interspecies models. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **319**, L932–L940 (2020).
203. Ribeiro, R. V. P. *et al.* Ex vivo treatment of cytomegalovirus in human donor lungs using a novel chemokine-based immunotoxin. *J. Heart Lung Transplant.* **41**, 287–297 (2022).
204. Hui, K. P. Y. *et al.* Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Respir. Med.* **8**, 687–695 (2020).
205. Alfi, O. *et al.* Human Nasal and Lung Tissues Infected Ex Vivo with SARS-CoV-2 Provide Insights into Differential Tissue-Specific and Virus-Specific Innate Immune Responses in the Upper and Lower Respiratory Tract. *J. Virol.* **95**, 10.1128/jvi.00130-21 (2021).
206. Chu, H. *et al.* Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-

- CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 1400–1409 (2020).
207. Dumigan, A. *et al.* A Porcine Ex Vivo Lung Perfusion Model To Investigate Bacterial Pathogenesis. *mBio* **10**, e02802-19 (2019).
208. Stone, J. P. *et al.* Altered Immunogenicity of Donor Lungs via Removal of Passenger Leukocytes Using Ex Vivo Lung Perfusion. *Am. J. Transplant.* **16**, 33–43 (2016).
209. Mould, K. J. *et al.* Airspace Macrophages and Monocytes Exist in Transcriptionally Distinct Subsets in Healthy Adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **203**, 946–956 (2021).
210. Grant, R. A. *et al.* Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature* **590**, 635–641 (2021).
211. Mitsui, Y. *et al.* Expression of the readthrough transcript CiDRE in alveolar macrophages boosts SARS-CoV-2 susceptibility and promotes COVID-19 severity. *Immunity* **56**, 1939-1954.e12 (2023).
212. Lv, J. *et al.* Distinct uptake, amplification, and release of SARS-CoV-2 by M1 and M2 alveolar macrophages. *Cell Discov.* **7**, 24 (2021).
213. Olivier, T., Blomet, J. & Desmecht, D. Central role of lung macrophages in SARS-CoV-2 physiopathology: a cross-model single-cell RNA-seq perspective. *Front. Immunol.* **14**, 1197588 (2023).
214. Eymieux, S. *et al.* Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and

- virion release. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 3565–3576 (2021).
215. Scott, C. L., Henri, S. & Guilliams, M. Mononuclear phagocytes of the intestine, the skin, and the lung. *Immunol. Rev.* **262**, 9–24 (2014).
216. García-Nicolás, O., Godel, A., Zimmer, G. & Summerfield, A. Macrophage phagocytosis of SARS-CoV-2-infected cells mediates potent plasmacytoid dendritic cell activation. *Cell. Mol. Immunol.* **20**, 835–849 (2023).
217. Lempp, F. A. *et al.* Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature* **598**, 342–347 (2021).
218. De Wolf, J. *et al.* Challenging the Ex Vivo Lung Perfusion Procedure With Continuous Dialysis in a Pig Model. *Transplantation* **106**, 979 (2022).
219. Sage, A. T. *et al.* Prediction of donor related lung injury in clinical lung transplantation using a validated ex vivo lung perfusion inflammation score. *J. Heart Lung Transplant.* **40**, 687–695 (2021).
220. Webb, H. H. & Tierney, D. F. Experimental Pulmonary Edema due to Intermittent Positive Pressure Ventilation with High Inflation Pressures. Protection by Positive End-Expiratory Pressure. *Am. Rev. Respir. Dis.* **110**, 556–565 (1974).
221. Tremblay, L., Valenza, F., Ribeiro, S. P., Li, J. & Slutsky, A. S. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J. Clin. Invest.* **99**, 944–952 (1997).
222. Aboelnazar, N. S. *et al.* Negative pressure ventilation decreases inflammation and lung edema during normothermic ex-vivo lung perfusion. *J. Heart Lung Transplant.*

- 37**, 520–530 (2018).
223. Huang, L. *et al.* L-alanyl-L-glutamine modified perfusate improves human lung cell functions and extend porcine ex vivo lung perfusion. *J. Heart Lung Transplant.* **42**, 183–195 (2023).
224. Gassner, J. M. G. V. *et al.* Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine. *Liver Transpl.* **25**, 275 (2019).
225. Nakajima, D. *et al.* Mesenchymal stromal cell therapy during ex vivo lung perfusion ameliorates ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **38**, 1214–1223 (2019).
226. Mordant, P. *et al.* Mesenchymal stem cell treatment is associated with decreased perfusate concentration of interleukin-8 during ex vivo perfusion of donor lungs after 18-hour preservation. *J. Heart Lung Transplant.* **35**, 1245–1254 (2016).
227. Svensson, V. *et al.* Power analysis of single-cell RNA-sequencing experiments. *Nat. Methods* **14**, 381–387 (2017).

