



**HAL**  
open science

# Étude métabolomique de la polarisation des macrophages pulmonaires humains

Fanta Fall

► **To cite this version:**

Fanta Fall. Étude métabolomique de la polarisation des macrophages pulmonaires humains. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Saclay, 2019. Français. NNT: 2019SACLV064 . tel-02519099v1

**HAL Id: tel-02519099**

**<https://theses.hal.science/tel-02519099v1>**

Submitted on 25 Mar 2020 (v1), last revised 15 May 2020 (v2)

**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.

Étude métabolomique de la polarisation des macrophages  
pulmonaires humains

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
Préparée à Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (UVSQ)

n°577 : structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)  
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Suresnes, le 07 Octobre 2019, par

**Fanta Fall**

NNT : 2019SACLV064

Composition du Jury :

Nelly Frossard Directrice de recherche, Université de Strasbourg (Inserm UMR 7200 CNRS)	Présidente
Vincent Lagente Professeur des Universités, Université de Rennes (Institut NUMECAN - Inserm U1241)	Rapporteur
Philippe Devillier PU-PH, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (UPRES EA 220, Hôpital Foch)	Examineur
Mikael Croyal Ingénieur de recherche, Université de Nantes (UMR 1280, Centre de recherche en nutrition humaine Ouest)	Examineur
Stanislas Grassin-Delyle MCU-PH, Université de Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines (Inserm U1173, infection et inflammation, Hôpital Foch)	Directeur de thèse

En premier lieu, je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail, et ce, malgré leur charge de travail. J'adresse mes plus sincères remerciements aux Professeurs Vincent Lagente et Nelly Frossard pour me faire l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également le Professeur Philippe Devillier et le Docteur Mikael Croyal.

Les travaux présentés dans ce mémoire de thèse ont été réalisés à la plateforme de spectrométrie de masse, au sein de l'unité infection et inflammation INSERM U1173 de L'UVSQ. Je remercie sincèrement le Docteur Stanislas Grassin Delye d'avoir dirigé mes travaux de thèse durant ces 3 années. Son aide, sa clairvoyance, sa rigueur et ses bons conseils ont été des atouts précieux. Merci pour ton soutien indéfectible, ta patience, le fromage et ta bonne humeur.

Cette thèse est le fruit d'un travail collaboratif avec le CEA donc merci aux Docteurs Etienne A. Thévenot et Natacha Lenuzza. Un grand merci pour leur très bon accueil et la qualité de nos échanges au cours de cette collaboration.

Je remercie le Docteur Emanuel Naline et Marion Brollo pour leur précieuse aide et conseils sur la partie collecte des échantillons. Merci Marion pour ta disponibilité et ta gentillesse.

Un grand merci également à Elodie LAMY et Jéjo pour les soirées fondues, les crêpes party, les courses et beaucoup d'autres choses. Merci ma Elodie pour ton amitié, tes conseils et ton aide pour les manips. Ma Cassie ta gentillesse, ta bienveillance et ton amitié m'auront été bien précieux durant ces trois dernières années. Merci pour avoir été là pour moi dans tous les moments importants. Merci à mes collègues les MasSpecPowaaa (Nico, Marie, Pamela, Imté) pour tous les moments agréables et les conseils. Merci à Arnaud et l'équipe LARENES pour votre bonne humeur et vos conseils au quotidien. Merci Adeline pour tous les petits gâteaux, les conseils et pour avoir pris le temps de me relire. Merci à tous les membres et doctorants de l'unité 1173.

Un grand merci Mikael pour m'avoir fait aimer la recherche et donné envie d'en arriver où je suis. Merci à Zied, Stephanie et Audrey pour votre amitié et pour les belles années à Nantes.

Un grand merci à mes amis, la team voyage et les thérapeutes. Merci à ma Marième pour ton amitié, ta gentillesse, la motivation et pour tout l'amour que tu me portes. Merci à ma grande copine Marie Pierre pour nos discussions à 8h du matin, pour ton amitié et ton soutien. Merci à Abdoul, à Moussa, à Seydina, à Mbayang pour votre amitié. Merci Saer pour ta présence dans ma vie cette dernière année et tout ce que tu y apportes.

Merci maman et merci papa, merci du fond du cœur pour votre amour et votre soutien, sans vos efforts et vos sacrifices je ne serai jamais arrivée loin. Vous vous êtes sacrifiés et privés bien trop de fois pour notre bien-être et nos études. Dans une autre vie, je vous choisirais encore et encore comme parents. Vous êtes ma force, mes rocks, mes piliers. Mes remerciements ne suffiront jamais assez pour vous exprimer mon ressentie à votre égard donc je vais juste continuer à prier pour vous.

À Floriane et Jeannot je tenais à exprimer ma profonde gratitude. Merci pour tout, Merci d'être une seconde famille pour moi, merci pour votre amour surtout. Vous m'avez encouragé et soutenu depuis ma première année à Marseille. Merci, je ne le dirai jamais assez.

Yacine je ne peux que te remercier, ta réussite, ton courage et ta persévérance ont toujours été des modèles pour tes petites sœurs, à mon mini moi, ma grande copine et mon amour de petite sœur Adja, à mes frères que j'aime de tout mon cœur aussi.

Grâce à vous la famille est un pilier sans faille sur lequel nous pouvons tous compter

« lep yeine leu yalnalein Yalla fay ».

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	1
INDEX DES FIGURES .....	3
INDEX DES TABLEAUX .....	5
ABRÉVIATIONS .....	6
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....	9
CHAPITRE I : LES MACROPHAGES PULMONAIRES .....	9
I. Origine.....	9
II. Localisation .....	11
III. Fonction .....	12
IV. La polarisation des macrophages.....	12
1. Généralités .....	12
2. Polarisation des macrophages et infections bactériennes/virales .....	15
3. Polarisation des macrophages dans les pathologies pulmonaires.....	18
4. Métabolisme cellulaire au cours de la polarisation .....	23
4.1. Métabolisme de l'arginine.....	25
4.2. Le métabolisme de l'oxygène .....	27
4.3. Métabolisme du glucose et cycle de Krebs .....	28
4.4. Le métabolisme lipidique .....	32
4.5. Voies des kynurénines.....	39
V. Les oxystérols .....	42
VI. Métabolomique et macrophages .....	50
CHAPITRE II : LA MÉTABOLOMIQUE.....	52
I. Généralités.....	52
II. Méthodologie.....	54
III. Approches analytiques en métabolomique .....	55
IV. Acquisition et traitement des données en métabolomique .....	56
1. Collecte et préparation des échantillons .....	57
2. L'acquisition par spectrométrie de masse .....	61
2.1. Séparation Chromatographique.....	61
2.2. La detection par spectrométrie de masse.....	68
3. Traitement des données en MS métabolomique.....	75

4. Analyses statistiques.....	79
5. Annotations des métabolites.....	81
6. Identifications des réseaux métaboliques.....	83
OBJECTIF DE LA THÈSE.....	84
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	86
I. Cultures cellulaires et échantillonnage.....	86
1. Dissection du poumon et isolement des cellules.....	86
2. Traitement des macrophages.....	87
3. Récupération des cellules.....	87
II. Matériels.....	87
III. Méthodes de spectrométrie de masse : étude non ciblée.....	88
1.1. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	88
a. Préparation des échantillons.....	88
b. Séparation chromatographique.....	88
c. Paramètres de source.....	90
d. Paramètres d'acquisition.....	90
e. Analyses des données.....	90
1.2. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	92
a. Préparation des échantillons.....	92
b. Paramètres de spectrométrie de masse et de chromatographie.....	94
1.3. Traitements des données et analyses statistiques.....	95
RÉSULTATS.....	96
ARTICLE 1.....	97
ARTICLE 2.....	100
MODULATION DE LA VOIE DES OXYSTEROLS AU COURS DE LA POLARISATION M1/M2 DES MACROPHAGES PULMONAIRES.....	108
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	119
REFERENCES.....	134

## INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Origine des macrophages.....	10
Figure 2 : Les différentes lignées de macrophages et propriétés fonctionnelles des sous-populations de macrophages tissulaires [9].....	11
Figure 3 : Trois sous-populations de macrophages M2 et leur stimuli respectifs [35] .....	14
Figure 4 : Dysfonctionnement des macrophages dans l'asthme [56] .....	19
Figure 5 : Représentation schématique des fonctions des macrophages de type M1 et M2 dans le développement tumoral [78].....	22
Figure 6 : Rôle de la polarisation M1/M2 dans la modulation du métabolisme cellulaire des macrophages [80] .....	24
Figure 7 : Représentation schématique simplifiée du métabolisme de l'arginine; CP, phosphate de carbamoyle .....	26
Figure 8 : Synthèses des différentes formes de ROS ; SOD : Superoxyde dismutase .....	27
Figure 9 : Profil métabolique d'un macrophage M1 [86] .....	31
Figure 10 : Profil métabolique d'un macrophage M2 [86] .....	32
Figure 11 : Mesure des métabolites appartenant au métabolisme pyrimidique en fonction de différents types de stimuli [115].....	35
Figure 12 : Voie de l'acide arachidonique .....	36
Figure 13 : Heatmaps représentant l'expression des transcrits des gènes de cytokines (A), du métabolisme lipidique (voie de l'acide arachidonique) (B) et des protéines membranaires (C) qui ont été trouvés exprimés différemment entre les macrophages pulmonaires humains témoins, traités par LPS et traités par IL-4. Les résultats ont été obtenus avec des macrophages de trois donneurs indépendants cultivés pendant 24 heures. Une échelle de couleur rouge-vert représente les niveaux d'expressions normalisés (rouge : élevés, vert : bas).	38
Figure 14 : Voie métabolique des kynurénines .....	39
Figure 15 : Stéroïdes et oxystéroïdes biologiquement actifs [140] .....	45
Figure 16 : Structure et origine de certains oxystéroïdes [144] .....	47
Figure 17 : Étude transcriptomique (RT-qPCR) : effet du LPS et de l'IL4 sur les macrophages pulmonaires humains (UPRES EA220) .....	49
Figure 18 : Les sciences omiques.....	52

Figure 19 : Diversité physico-chimique des métabolites (Mooc la métabolomique, Alain Bouchereau, Université de Rennes 1) .....	54
Figure 20 : Design expérimental d'une analyse en Métabolomique .....	57
Figure 21 : Schéma d'une ionisation par électrospray .....	69
Figure 22 : La spectrométrie de masse en tandem .....	71
Figure 23 : Q Exactive hybride, spectromètre de masse quadrupole-Orbitrap .....	73
Figure 24 : Workflow général du retraitement des données en métabolomique (E. Thévenot, CEA).....	75
Figure 25 : Traitement des données LC-MS brutes par XCMS adapté de Smith <i>et al</i> [238] .	78
Figure 26 : Q Exactive hybride, spectromètre de masse quadrupole-Orbitrap, RF optimisé automatiquement .....	99
Figure 27 : Analyse en mode positif et négatif PLS-DA des cellules et surnageant des macrophages pulmonaires humains .....	102
Figure 28 : Représentation des variables discriminantes entre les groupes témoins et IL-4 et VIP score. En ordonnées les variables et en abscisse les valeurs des scores VIP.....	103
Figure 29 : Classification hiérarchique des groupes étudiés en fonction des variables différenciellement exprimées dans les cellules et surnageants en mode positif et négatif. Chaque colonne représente un échantillon et chaque ligne une variable correspondant à une masse $m/z$ et Tr. La couleur rouge signifie une augmentation et la couleur bleue une baisse de l'expression de ce métabolite. ....	105
Figure 30 : Quantification des métabolites appartenant à la voie des kynurénines en cas de polarisation M1/M2.....	107
Figure 31 : Expression des oxystérols et des stérols dans les macrophages pulmonaires humains polarisés n=8, les résultats sont représentés sous forme de boîte à moustache. Les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie d'un test t* indique une différence significative avec le témoin (*p<0.05).....	116



## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Hétérogénéité des macrophages [36]. .....	15
Tableau 2. Liste de publications utilisant plusieurs types de colonne. ....	65
Tableau 3. Conditions LC-MS pour l'analyse .....	89
Tableau 4. Préparation des standards : mélange de référence « CQ externe.....	92
Tableau 5. Préparation des standards : étalons internes .....	93
Tableau 6. Variables significatives entre les macrophages pulmonaires humains IL-4 vs Témoins .....	106
Tableau 7. Population de macrophages pulmonaires utilisées pour l'analyse ciblée de la voie des oxystérols .....	109
Tableau 8. Préparation de la gamme oxystérols.....	110
Tableau 9. Liste de molécules analysées avec les différents paramètres et énergies de collision .....	112
Tableau 10 : Quantification des oxystérols en GC-MS dans du contenu intracellulaire (n=8) .....	114
Tableau 11 : Tableau comparatif des résultats de quelques méthodes analysant le métabolome plasmatique chez l'homme par LC-MS. ....	122

# ABRÉVIATIONS

- ABCA1** : ATP-binding cassette A1
- ACN** : Acétonitrile
- ACP** : Analyse en Composante Principale
- Arg-1** : Arginase 1
- ASL** : Argininosuccinate Lyase
- ASS1** : Argininosuccinate Synthase
- ATP** : Adénosine-Triphosphate
- BAL** : Lavage Broncho-alvéolaire
- BMDM** : Bone Marrow-Derived Macrophage
- BPCO** : Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive
- CARKL** : Carbohydrate Kinase-Like protein
- CCL** : Chemokine (C-C motif) Ligand
- CCR** : CC chemokine receptor
- CD** : Cellules dendritiques
- CFU-M** : Cloning Forming Unit of Macrophage
- CFU-ML** : Colony Forming Unit of Myeloid and Lymphoid cells
- CHCL<sub>3</sub>** : Chloroforme
- CH25H** : 25-Hydroxycholestérolase
- COX** : Cyclooxygénase
- CPS** : Carbamoyl Phosphate Synthétase
- CQ** : Contrôle qualité
- CSF** : Colony Stimulating Factor
- CXCL** : C-X-C motif chemokine
- EBI2** : Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2
- EI** : Impact Électronique
- ESI** : Electrospray / Electronébulisation
- EtOH** : Ethanol
- FAD** : Flavine Adénine Dinucléotide
- FAME** : Fatty Acid Methyl Ester
- GC** : Chromatographie Gazeuse
- GM-CSF** : Granulocyte Macrophage

**HIF** : Hypoxia Inducible Factors  
**HILIC** : Chromatographie d'interaction hydrophile  
**HMDB** : Human Metabolome Database  
**H<sub>2</sub>O** : Eau  
**IDO** : Indoleamine 2,3 Dioxygénase  
**IFN** : Interferon  
**Ig** : Immunoglobuline G  
**IL** : Interleukine  
**iNOS** : Oxyde Nitrique Synthase Inductible  
**INSIG** : Insulin-induced gene 1  
**IPO** : Isotopologue Parameter Optimization  
**ISOp** : Isopropanol  
**KAT** : Kynurénine AminoTransférase  
**KMO** : Kynurénine-3-MonoOxygénase  
**L-Arg** : L-arginine  
**LC** : Chromatographie Liquide  
**LOX** : Lipoxygénase  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**LT** : Leucotriène  
**LXR** : Liver X Receptors  
**M-CSF** : Monocyte Colony-Stimulating Factor  
**MDM** : Macrophages Dérivés de Monocytes  
**MeOH** : Méthanol  
**MEOX** : Méthoxyamine  
**MHC** : Major Histocompatibility Complex  
**MR** : Récepteur Mannose  
**MRM** : Multiple Reaction Monitoring  
**MSTFA** : N,O Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide  
**m/z** : masse/charge  
**NAD** : Nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADPH** : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate  
**NF-κB** : Nuclear Factor-Kappa B  
**NO** : Oxyde Nitrique  
**NOS** : Oxyde Nitrique Synthase

**NOX** : NADPH Oxydase  
**OAT** : Ornithine Aminotransférase  
**ODC** : Ornithine Décarboxylase  
**OH<sup>•</sup>** : Radical Hydroxyle  
**OTC** : Ornithine Transcarbamylase  
**PG** : Prostaglandine  
**PGC-1 $\beta$**  : Peroxisome proliferator-activated receptor  
**PGES** : Prostaglandin E Synthase  
**PLA2** : phospholipase A2  
**PLS** : Partial Least Squares  
**PLSDA** : Partial Least Square-Discriminant Analysis  
**PPAR** : Peroxisome Proliferator Activated Receptor  
**PPR** : Récepteurs de l'immunité innée  
**PPS** : Peak Picking Score  
**PTGS** : Prostaglandin-Endoperoxide Synthase  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire  
**RNI** : intermédiaires azotés réactifs  
**ROI** : Espèces réactives de l'oxygène Intermédiaire  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**RP** : Reverse Phase  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute  
**RT-qPCR** : Reverse Transcriptase-Quantitative Polymerase Chain Reaction  
**SM** : Spectrométrie de masse  
**SREBPs** : Sterol Response Element-Binding Proteins  
**STAT** : Signal Transducer And Activator Of Transcription  
**TAM** : Tumour Associated Macrophages  
**TDO** : Tryptophane 2,3 di-oxygénase  
**TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor  
**Th** : Lymphocytes T auxiliaires  
**TLR** : Toll-Like Receptors  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**Tr** : Temps de rétention  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## CHAPITRE I : LES MACROPHAGES PULMONAIRES

### I. Origine

Le terme macrophages a été utilisé pour la première fois par Metchnikoff à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle [1] pour identifier les cellules responsables de la phagocytose. Les macrophages sont une population de leucocytes définis par leur localisation, leur phénotype, leur morphologie et leur profil d'expression génétique [2], [3].

Les macrophages ont comme précurseur initial le CFU-ML (*Colony Forming Unit of Myeloid and Lymphoid cells*). Les CFU-ML, en présence de cytokines telles l'IL-3 et l'IL-6, de même que le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), se différencient en CFU-GM (*Granulocyte Macrophage*). En présence de GM-CSF, M-CSF (*Monocyte Colony-Stimulating Factor*), les CFU-GM se différencient en CFU-M (*Colony Forming Unit of Macrophage*) puis en monocytes. Une fois distribués dans la circulation sanguine, les monocytes pénètrent dans tous les compartiments tissulaires de l'organisme où ils vont se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques myéloïdes. Une fois différenciés, les macrophages sont capables de rester plusieurs mois dans les tissus [4], [5].

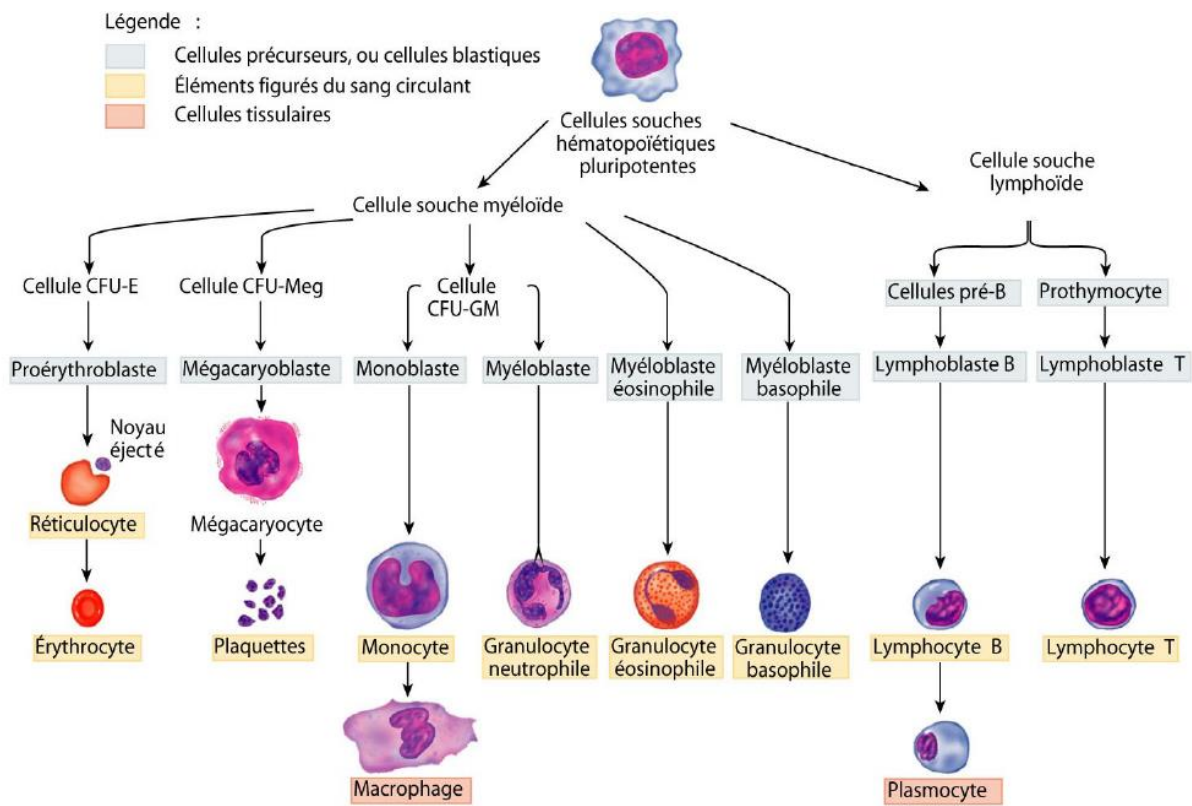


Figure 1 : Origine des macrophages

## II. Localisation

Chez les mammifères, l'origine du macrophage se trouve principalement dans la moelle osseuse [6]. On retrouve les macrophages dans le foie (cellules de Kupffer), dans la rate et les différentes cellules lymphoïdes, dans les poumons, dans les os, dans le tissu conjonctif, dans la moelle osseuse, dans la peau, la microglie et dans presque tous les autres tissus du corps [4], [7], [8].

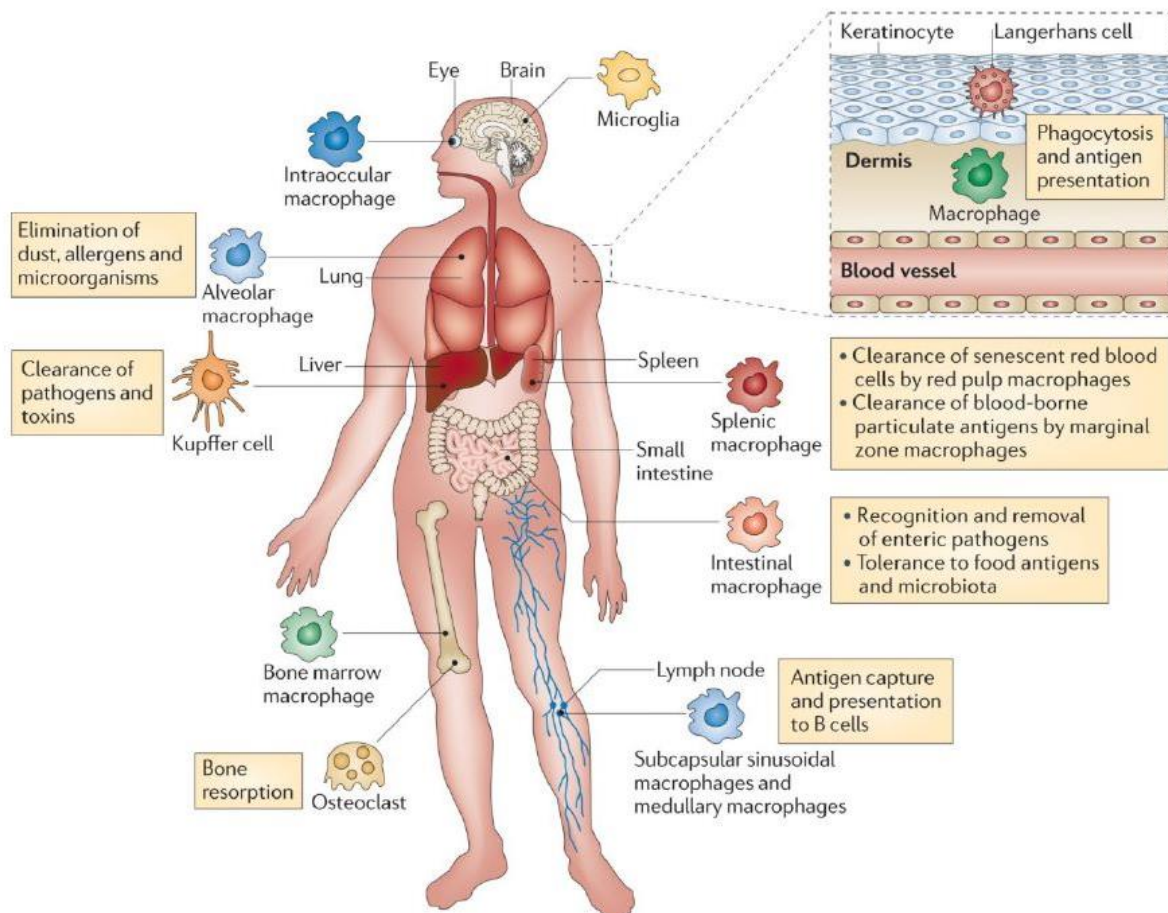


Figure 2 : Les différentes lignées de macrophages et propriétés fonctionnelles des sous-populations de macrophages tissulaires [9]

Les macrophages pulmonaires sont les seuls directement exposés à l'environnement extérieur [9]. Les macrophages pulmonaires sont séparés en 3 classes: alvéolaires, interstitiels et intravasculaires [10]. La majorité des macrophages pulmonaires sont localisés au niveau

alvéolaire. Les macrophages alvéolaires jouent un rôle central dans le recyclage de molécules tensioactives produites par les cellules épithéliales alvéolaires [11]. Les macrophages tissulaires sont présents dans le parenchyme pulmonaire. Les macrophages intravasculaires sont, quant à eux présents, présents au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins.

### **III. Fonction**

Les macrophages jouent un rôle important dans les réponses innées et adaptatives. Ils participent à des mécanismes d'homéostasie et sont en première ligne de défense contre les pathogènes envahissants, où ils agissent comme effecteurs de la réponse immunitaire [7], [12]. Ils sont impliqués dans le développement des maladies inflammatoires des voies aériennes comme l'asthme et la broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO) [13]–[15].

La réponse innée est caractérisée par la production d'agents microbicides, la phagocytose et son implication dans les mécanismes de défense de l'organisme. La réponse adaptative est caractérisée par la présence de cellules d'antigènes et par l'activation des lymphocytes T [16]. Les macrophages pulmonaires interagissent avec leur environnement via l'expression de nombreux récepteurs membranaires tels que les récepteurs au mannose, les "scavenger receptor", les récepteurs Fc (récepteurs pour les IgG, IgE et IgA) qui permettent au macrophage alvéolaire de phagocyter les antigènes reconnus et agrégés par les anticorps, et les PRR (Pattern Recognition Receptors) [17].

### **IV. La polarisation des macrophages**

#### **1. Généralités**

Le terme polarisation a été utilisé pour la première fois en 1986 par Mosmann pour décrire deux populations de lymphocytes murins Th1 et Th2 en fonction du stimulus rencontré [18].

Plusieurs classes de macrophages ont été décrites chez l'Homme et la souris en fonction de l'expression de leurs marqueurs de surface cellulaire, de la production de facteurs spécifiques



et de l'activité biologique. Les deux sous populations majeures sont les macrophages M1 et M2 [2]. Une classification M1/M2 des macrophages a été proposée sur le modèle de la polarisation lymphocytaire Th1/Th2.

Le type de population dépend de l'agent d'activation, du type de cytokines produites et des protéines membranaires exprimées. Les macrophages M1 sont généralement induits par les cytokines Th1, telles que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et le *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ), ou par reconnaissance des lipopolysaccharides bactériens (LPS). Ces macrophages produisent des concentrations plus élevées de cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 et cyclooxygénase-2 (COX-2) et de faibles concentrations de IL-10 [2]. Les macrophages M2, se polarisent avec les cytokines Th2 : IL-4 et IL-13 via l'activation de STAT6 (*Signal Transducer And Activator Of Transcription*) par le récepteur IL-4 alpha (IL-4R $\alpha$ ). En plus de l'IL-4 et de l'IL-13, d'autres cytokines comme l'IL-10 peuvent régir la polarisation M2 en activant STAT3 par le récepteur IL-10 (IL-10R). Les macrophages M2 ont un profil de cytokines anti-inflammatoires qui se caractérise par une faible production d'IL-12 et une production élevée d'IL-10 et du facteur de croissance TGF- $\beta$  [2], [19], [20].

Contrairement aux macrophages activés par la voie classique (cytokines de type 1 et produits microbiens) [21], l'expression des macrophages induite par l'IL-4 a été décrite comme une «activation alternative» [2], [22], [23]. Cette nouvelle classification a été introduite par MILLS dans les années 2000, où il a été montré qu'une production d'oxyde nitrique (NO) est générée à partir de l'arginine chez les macrophages de souris de type Th1, produisant principalement de l'IFN- $\gamma$ , alors que chez les macrophages de souris de type Th2, produisant de l'IL-4, c'est une production d'ornithine qui est observée [24]. Les macrophages M1 phagocytent les microbes et initient une réponse immunitaire. Ils produisent du NO ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS) pour détruire les bactéries et les virus.

En 2004, Mantovani *et al* ont montré que les macrophages de type M2 pouvaient être divisés en trois sous populations : M2a, M2b et M2c dépendant des stimuli appliqués et des modifications transcriptionnelles induites (Figure 3) [25]–[27]. Les macrophages M2a sont induits par les interleukines IL-4 et IL-13, les M2b sont activés par l'activation des complexes immunitaires de type G associés à des agonistes des toll-like receptors (TLR) ou par les récepteurs de IL-1 associés aux agonistes des TLR. Les macrophages M2c sont activés par IL-10 via STAT3, les TGF- $\beta$  et les hormones glucocorticoïdes. Les macrophages M2a sont considérés comme cicatriciels. Ils expriment des niveaux élevés du récepteur du mannose (MR ou CD206) et sécrètent des facteurs pro-fibrotiques tels que la fibronectine, le facteur de

croissance insulino-like (IGF) et le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Les macrophages M2b et M2c sont qualifiés de régulateurs et anti-inflammatoires et ils présentent des niveaux d'expression élevés de la tyrosine kinase du récepteur Mer (MerTK), ce qui leur confère une grande capacité d'efferocytose. Il a été observé que les macrophages M2b produisent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF), de faibles concentrations d'IL-12 et des niveaux beaucoup plus élevés d'IL-10 en comparaison des macrophages de type M2a, ce qui remet en question leur caractère anti-inflammatoire [28]–[34]. Un nouveau sous-ensemble de macrophage M2 est apparu récemment, les macrophages M2d connus sous le nom de macrophages associés aux tumeurs (TAM). Ils sont activés par co-stimulation des ligands TLR avec des agonistes du récepteur A2 adénosine (A2R) ou par l'IL-6. Les M2d sont caractérisées par une concentration élevée d'IL-10, de TGF- $\beta$ , du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), d'une faible concentration d'IL-12, de TNF- $\alpha$  et d'une production d'IL-1 $\beta$  [2], [34].

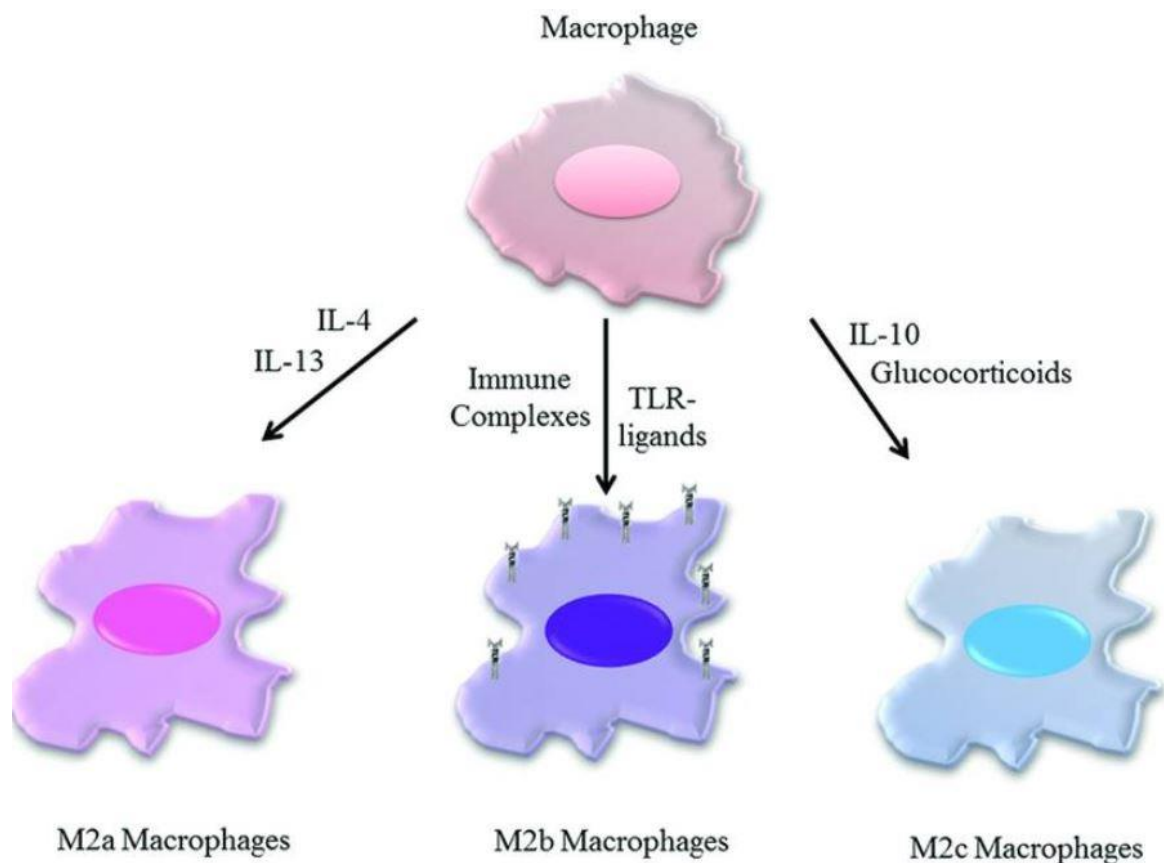


Figure 3 : Trois sous-populations de macrophages M2 et leur stimuli respectifs [35]

Tableau 1. Hétérogénéité des macrophages [36].

	Cytokines	Chimiokines	Récepteurs
Macrophages activés par la voie classique			
<b>Macrophages M1</b>	IL-1, IL-16, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$	CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16	CCR7, TLR2, TLR4, IL-1RI, CD80, CD86, MHC classe II
Macrophages activés par la voie alterne (macrophages cicatriciels)			
<b>Macrophages M2a</b>	IL-10, IL-1ra	CCL17, CCL18, CCL22, CCL24	CXCR1, CXCR2, CD23, CD163, MR, SR, MHC classe II
Macrophages régulateurs			
<b>Macrophages M2b</b>	IL-10, IL-1, TNF, IL-6	CCL1	CD80, CD86, MHC classe II
<b>Macrophages M2c</b>	IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1ra	CCL16, CCL18, CXCL13	CCR2, CD14, CD150, MR, SR
<b>Macrophages M2d</b>	IL-12 <sup>low</sup> , IL-10 <sup>high</sup>	CCL5, CXCL10, CXCL16	VEGF

## **2. Polarisation des macrophages et infections bactériennes/virales**

La réponse des macrophages aux infections bactériennes implique principalement la régulation à la hausse des gènes impliqués dans la polarisation M1. Il s'agit notamment des gènes codant pour des cytokines telles que TNF, IL-6, IL-12, des récepteurs de cytokines tels que IL-7R et IL-15RA, des chimiokines telles que CCL2, CCL5 et CXCL8, et le récepteur CCR7 des chimiokines. Les macrophages M2 sécrètent des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-1ra, qui peuvent les distinguer des macrophages M1. Ils possèdent un faible pouvoir microbicide. L'IL-1ra, antagoniste du récepteur de l'IL-1, s'associe à l'IL-4 et l'IL-13 pour moduler l'activité pro-inflammatoire de l'IL-1 $\beta$  [37], [38].

La polarisation M1 est observée au cours des maladies infectieuses aiguës. L'état M1 doit rester temporaire et sous le contrôle des cytokines. L'action prolongée et exagérée de l'activité inflammatoire des macrophages peut s'avérer néfaste si celle-ci n'est pas contrôlée. À titre d'exemple, les souches *Escherichia coli* ou *Streptococcus sp.* *E. coli* provoquent différentes infections aiguës comme le sepsis dont la réponse inflammatoire et immune exagérée conduit à des atteintes tissulaires pouvant entraîner la mort du patient. Une corrélation entre les concentrations élevées de cytokines de type 1 et la mortalité des patients avec sepsis sévère a été établie [38].

Pour survivre dans les macrophages, certaines bactéries ont mis en place des mécanismes qui inhibent l'activité pro-inflammatoire et anti-microbienne de leurs hôtes ce qui perturbe l'activité des macrophages M1. Des salmonelles ou mycobactéries peuvent neutraliser les effecteurs microbicides associés à la polarisation M1 tel que la *Salmonella enterica* sérotype typhimurium qui inhibe l'assemblage de la NADH synthase ; un complexe enzymatique à l'origine des dérivés bactéricides de l'oxygène [38], [39].

La phase initiale de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* est marquée par une polarisation M1 et une réponse immunitaire de type Th1 [40]. Au fur et à mesure de l'infection, on observe une inhibition de la polarisation M1 par sécrétion de facteurs de virulence telle que le lipoarabinomannane qui empêche la maturation des phagosomes, ou la protéine cible antigénique 6 (ESAT-6) [41]. ESAT-6 sécrétée précocement par *M. tuberculosis* inhibe directement l'activation des facteurs de régulation de NF- $\kappa$ B [42]. NF- $\kappa$ B est un complexe protéique qui joue un rôle central dans la réponse immunitaire et dans les réactions inflammatoires [43].

*Mycobacterium bovis* inhibe la production de NO et des dérivés bactéricides [44]. Une autre stratégie consiste à inhiber la production de cytokines de la réponse M1 : *Brucella suis* inhibe la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages humains, ce qui a pour conséquence une baisse de la production d'IL-12 [45]. La forme intracellulaire de l'entéropathogène *Shigella flexneri* produit une forme modifiée et hypoacétylée de LPS qui échappe à la reconnaissance par TLR4 et provoque une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires à partir de macrophages dérivés de la moelle osseuse par M-CSF dans un modèle murin (BMDM) [46].

*Coxiella burnetii* est une bactérie intracellulaire obligatoire qui provoque la fièvre Q. L'infection à *C. burnetii* peut être aiguë ou chronique et présente un large éventail de manifestations cliniques allant d'un syndrome grippal à une pneumonie grave nécessitant des soins intensifs ou une infection chronique se manifestant principalement par une endocardite [47]. Les macrophages infectés par *C. burnetii* libèrent des molécules associées au phénotype M2 : IL-10, TGF $\beta$ 1, CCL18. Ils expriment le récepteur du mannose (MR) et la forme active de l'arginase-1. Ils sécrètent également des niveaux élevés d'IL-6 et de CXCL8, deux molécules associées à la polarisation M1. Les macrophages infectés par *C. burnetii* n'expriment pas d'autres molécules de la polarisation M1 comme le TNF, l'IL-12, le CD80 et le CCR7, et ils ne produisent pas de NO. L'hypothèse posée par Benoit *et al* est qu'il est

probable que l'IL-6 interfère avec la voie IFN- $\gamma$  et contribue à l'évolution chronique de la fièvre Q [38], [48].

Il apparait maintenant que l'évolution chronique des maladies infectieuses est liée à une programmation des macrophages vers un profil M2 au pouvoir microbicide plus faible avec beaucoup d'état intermédiaires. Chez des patients en phase avancée d'infection par *M. tuberculosis*, il a été montré une augmentation des cytokines immuno-régulatrices comme l'IL-10 et CD206. Ceci confirme une reprogrammation de la polarisation des macrophages vers un profil M2 [41], [49].

*Yersinia enterocolitica* chez les souris entraîne l'activation de l'arginase-1 et la production de TGF $\beta$ 1 et d'IL-4 [38]. La mise en place d'un phénotype M2 des macrophages est retrouvée dans certaines pathologies infectieuses chroniques, comme la Brucellose et les infections mycobactériennes chroniques caractérisées par une production importante d'IL-10 et d'IL-4 [38].

Le rôle de la polarisation M2 des macrophages dans l'évolution chronique des maladies infectieuses semble mieux établi dans la maladie de Whipple. La maladie de Whipple est une maladie systémique à évolution chronique qui est due à *Tropheryma whipplei*. Elle est associée à des infiltrats tissulaires de macrophages. Dans les macrophages infectés par *T. whipplei*, les gènes codant pour le CCL15 et l'IL-16 sont augmentés. L'IL-16 augmente la réplication bactérienne dans les macrophages.

La polarisation des macrophages est également impliquée dans les infections virales. Dans les macrophages dérivés de monocytes humains (MDMs), l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 oriente la polarisation des macrophages vers un profil M1 et entraîne une baisse des marqueurs de M2 (CD163, CD206, CCL18 et IL-10) dès les premiers stades de l'infection. Une sécrétion accrue des chimiokines associées à M1 (CCL3, CCL4 et CCL5) et une régulation à la baisse significative des récepteurs CD4 sont observées au début de l'infection [50]. Dans la phase chronique de l'infection, les macrophages s'orientent vers un profil M2a [51], [52]. Les macrophages M1 et M2a contribuent à endiguer l'infection au VIH [53]. Il a été démontré que les états de polarisation M1 ou M2 activés par IFN- $\gamma$  (plus TNF- $\alpha$ ) ou IL-4 dans les MDMs sont moins favorables à la réplication du VIH-1 dépendant du CCR5 que les MDMs témoins. L'infection par le VIH-1 agit probablement sur la polarisation des macrophages pour modifier la permissivité cellulaire et modifier le résultat de l'infection [50].

### **3. Polarisation des macrophages dans les pathologies pulmonaires**

- **Asthme et Allergie**

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique très courante associée à une inflammation des voies respiratoires. Elle est caractérisée par des symptômes tels que l'essoufflement, le sifflement et l'oppression thoracique. En fonction du phénotype, les macrophages jouent des rôles pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires importants dans l'asthme. Les macrophages ont la capacité d'initier une réponse pro-inflammatoire par la libération de certaines cytokines (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ), mais ils ont également la capacité de libérer des médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-10 [54]. La polarisation des macrophages est associée au développement de l'asthme [55].

Les macrophages alvéolaires des patients asthmatiques libèrent plus de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et de CXCL8 que les témoins sains, mais présentent une réponse inflammatoire diminuée en réponse à une stimulation au LPS [56]. Dans les cas d'asthme sévère, les macrophages polarisés M1 produisent de grande quantité de médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et NO [57]. Dans les populations souffrant d'asthme non sévère, la population de macrophage M2 est supérieure à la population de macrophage M1 [58]. Robbe *et al* ont montré que les macrophages M2 prédominaient dans les poumons du modèle d'asthme allergique alors que dans l'asthme non allergique, les macrophages M1 étaient retrouvés avec une forte population de cellules Th1 et Th17 [58], [59]. Chez les animaux asthmatiques, la polarisation M2 est caractérisée par une faible expression de CD86 et une forte présence de récepteur de surface cellulaire CD206. CD206 joue un rôle important dans la phagocytose des cellules M2 en augmentant l'efferocytose. Les cellules M2a sont caractérisées par l'expression de concentrations élevées d'IL-13, une cytokine jouant un rôle critique dans les réponses immunitaires allergiques et la production de mucus. Une corrélation entre les niveaux d'IL-13 et la sévérité de l'asthme a été trouvée chez des modèles animaux d'asthme allergique [60]. Kim *et al* ont étudié un modèle humain d'asthme pour comprendre la pathogenèse des maladies inflammatoires chroniques. Dans les liquides de lavage broncho-alvéolaires (BAL) de patients souffrant d'asthme grave, une augmentation des macrophages producteurs d'IL-13 a été observée en comparaison aux macrophages témoins normaux [61]. Récemment, Draijer *et al* ont rapporté que la prostaglandine E2 (PGE2) peut favoriser l'expression des cellules M2c exprimant l'IL-10 chez les souris asthmatiques [58].

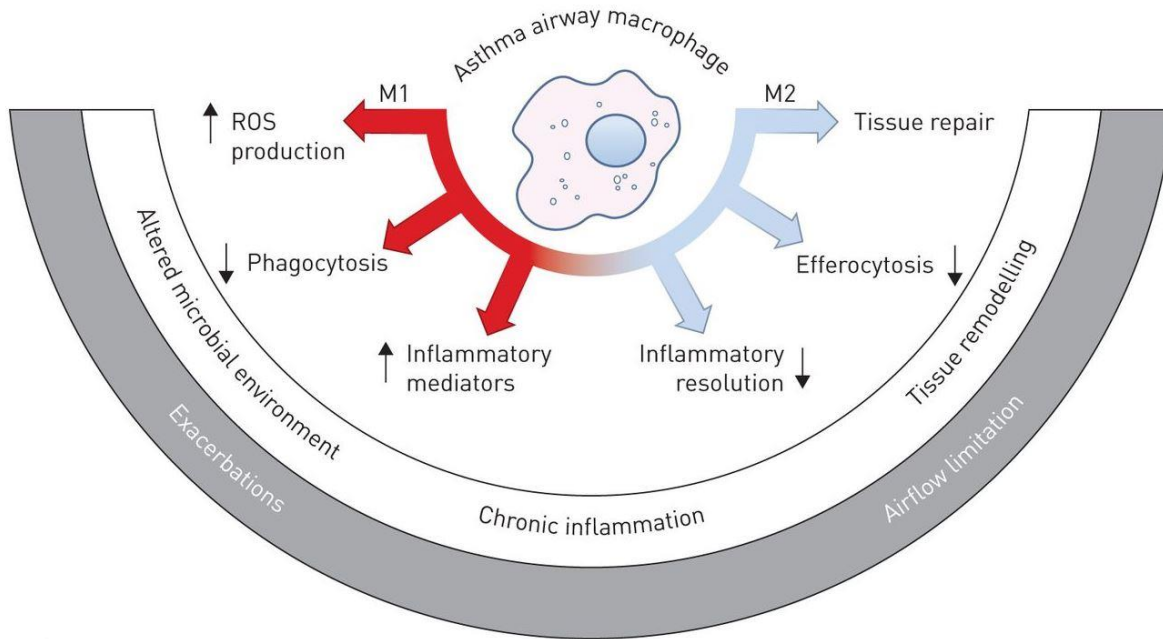


Figure 4 : Dysfonctionnement des macrophages dans l'asthme [56]

- **La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)**

La BPCO est une maladie chronique inflammatoire des bronches principalement causée par le tabagisme. Elle est caractérisée par un rétrécissement progressif des voies respiratoires et une obstruction permanente des voies aériennes et des poumons, entraînant une gêne respiratoire. Dans le BAL, une augmentation de la population de macrophages a été observée chez des fumeurs et chez des patients atteints de BPCO [62]–[64]. Ces derniers génèrent un milieu essentiellement pro-inflammatoire qui pourrait causer des lésions tissulaires, ainsi qu'une surveillance immunitaire défectueuse contribuant ainsi à la progression de la maladie [62].

L'oxyde nitrique synthase 2 (iNOS) est utilisée dans la littérature comme marqueur de la polarisation M1 tandis que les récepteurs CD206 et CD163 sont largement utilisés la polarisation M2 [65]. La polarisation M2 domine dans le BAL des macrophages alvéolaires des BPCO et des fumeurs avec une augmentation des concentrations de CCL22, IL-4, IL-13 en comparaison aux témoins non fumeurs [63]. Une diminution du marqueur de polarisation M1, l'IL-12, a été observée [63], [66] ainsi qu'une réduction de la population M1 dans les parois des voies respiratoires chez des fumeurs actifs et chez des ex fumeurs atteints de BPCO, réduisant la capacité des cellules à combattre les infections [63].

Le profilage transcriptionnel des BAL de macrophage de 24 non-fumeurs sains, 34 fumeurs sains et 12 fumeurs atteints de BPCO a été effectué pour voir l'influence du tabagisme sur la polarisation des macrophages [67]. Une comparaison entre les fumeurs sains et les non-fumeurs sains a révélé une baisse des gènes liés à la polarisation M1 (CD80, TNFSF10, IL1B, CXCL11, CXCL11, CXCL9 et CCL5) chez les fumeurs sains. Cette diminution des gènes codants pour les chimiokines de type I CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CCL5 était plus exacerbée chez les fumeurs BPCO. La régulation à la baisse des gènes liés à M1 semble être plutôt dépendante du tabagisme que de la maladie. Shaykhiev *et al* ont observé une reprogrammation vers un profil M2 au vu de l'augmentation de certains gènes liés à la polarisation M2 (CCR5, CD9, CD36, le récepteur à l'adénosine A3 (ADORA3) et les métalloprotéinases matricielle-2 (MMP-2) et MMP-7). Ces données nous montrent une corrélation entre le tabagisme et le phénotype de polarisation [67].

Bazzan *et al* ont utilisé iNOS comme marqueur de la polarisation M1 et ont montré que la proportion de macrophages M1 augmente avec la gravité de la maladie. Ils ont également montré que l'arrêt du tabac diminue significativement le pourcentage de macrophage M1 chez les fumeurs sans BPCO et chez les fumeurs atteints de BPCO légère. Cette diminution n'est pas observée chez les fumeurs atteints de BPCO grave ce qui suggère que la polarisation des macrophages pourrait être due non seulement au tabagisme, mais aussi à la réponse inflammatoire chronique caractéristique de la maladie [65].



- **Cancer pulmonaire**

Les macrophages jouent un rôle important dans le cancer pulmonaire. La production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages M1 améliore les fonctions anti-tumorales, la cytotoxicité et l'inhibition de la croissance tumorale [68]. Plusieurs études révèlent la présence de populations hétérogènes de macrophages dans des compartiments distincts au sein des tumeurs, selon le niveau d'hypoxie dans ces régions [69].

Les macrophages M2 ont été associés à l'initiation et à la progression des tumeurs. Les macrophages M2 favorisent la croissance de diverses cellules tumorales et augmentent la survie de ces cellules. Ils sont la population la plus représentée dans les TAM (*Tumour associated macrophages*) [70]. L'inhibition de la fonction antitumorale par la production des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$ , la production réduite de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 et IL-6) et la réduction de l'expression des récepteurs du mannose sur les macrophages alvéolaires peuvent contribuer à la progression et aux développements des métastases du cancer du poumon [68].

Le rôle de l'IL-10 dans le cancer pulmonaire est discuté. Yanagawa *et al* montrent que l'IL-10 est un puissant inhibiteur de l'angiogenèse tumorale. Dans des BAL de patients atteints de cancer pulmonaire, ils montrent que la production d'IL-10 par les macrophages alvéolaires stimulés par LPS augmente après une chimiothérapie [71]. L'IL-10 a par ailleurs été identifiée comme un inhibiteur potentiel des cytokines pro-inflammatoires qui jouent un rôle dans la destruction des cellules tumorales contribuant ainsi à la progression tumorale [72]. De plus, l'IL-10 diminue la fonction de l'appareil de golgi et du réticulum endoplasmique rugueux chez les patients atteints de cancer du poumon. Le dysfonctionnement de ces organelles qui permettent la traduction de l'ARNm en protéine et donc la production de cytokines telles que le TNF- $\alpha$  impacte la fonction des macrophages [68].

L'angiogenèse joue un rôle important dans la croissance, l'invasion et la métastase des tumeurs. Les macrophages alvéolaires contribuent à l'angiogenèse par la sécrétion de CXCL8 et du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) [68]. Les cellules tumorales induisent l'expression de la métalloprotéinase matricielle (MMP)-9 dans les macrophages pour favoriser la libération du VEGF [73]. CXCL8 est une chimiokine M1 responsable du recrutement et de l'activation des neutrophiles et des granulocytes sur les sites d'inflammation [74]. Son rôle est controversé, car elle favorise l'angiogenèse dans plusieurs cancers [74]. Une

concentration élevée de CXCL8 est corrélée à l'angiogenèse, à la progression de la tumeur et à une faible survie dans des cancers [75].

De plus les cellules M2 peuvent neutraliser les effets du phénotype M1 pro-inflammatoire et antitumoral [70]. Des stratégies de reprogrammation de profil M2 vers un profil M1 des macrophages sont explorées pour améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux [70], [73]. L'utilisation d'inhibiteur de STAT3 et STAT6 (sunitinib, sorafénib et fénrétinide) réduit la polarisation des macrophages en M2 et présente une immunité antitumorale améliorée. Les agonistes TLR représentent un traitement antitumoral prometteur. L'imiquimod est un ligand de TLR7 qui provoque la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B dans les macrophages entraînant une production de protéines pro-inflammatoires, telles que TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, et CCL2 [73], [76]. L'agoniste TLR3 (poly (I:C)) aide à la régression de la croissance tumorale en favorisant la polarisation des macrophages M2 en phénotype M1 [77], [78].

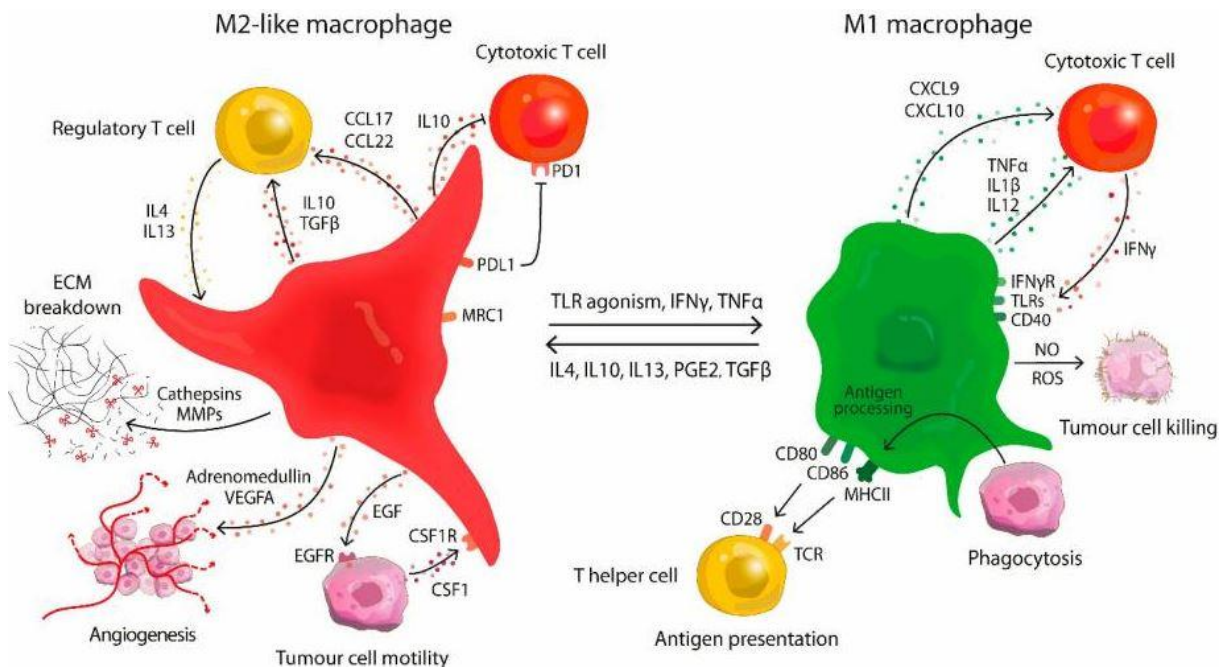


Figure 5 : Représentation schématique des fonctions des macrophages de type M1 et M2 dans le développement tumoral [78]

#### **4. Métabolisme cellulaire au cours de la polarisation**

Les sous-ensembles M1 et M2 sont caractérisés par une expression différentielle des cytokines, des chimiokines et des marqueurs de surface. Il y est observé des signatures moléculaires et une régulation transcriptionnelle différentes, ainsi que des variations au niveau des caractéristiques métaboliques entre les phénotypes M1 et M2 (Figure 6).

Il existe une différence métabolique claire entre les macrophages M1 et M2. Le métabolisme différentiel de l'arginine est à ce jour l'un des facteurs de discrimination les plus fiables entre les macrophages M1 et M2 dans des MDM humains cultivés avec de l'IFN- $\gamma$  ou du TNF- $\alpha$  [79]. Les métabolismes des acides aminés, du glucose, de l'oxygène, des lipides, du fer sont affectés au cours de la polarisation. En fonction du modèle et du type cellulaire, une modification différentielle du métabolisme de l'arginine, du tryptophane, de l'expression des protéines responsables de la capture de l'hème ou du stockage du fer ou des niveaux d'expression du glutathion est observée [80].

La population de macrophage M1 présente une forte teneur en ferritine caractérisée par un stockage du fer alors que la population M2 présente une forte teneur en ferroportine caractérisée par une exportation du fer dans des macrophages murins [80], [81].

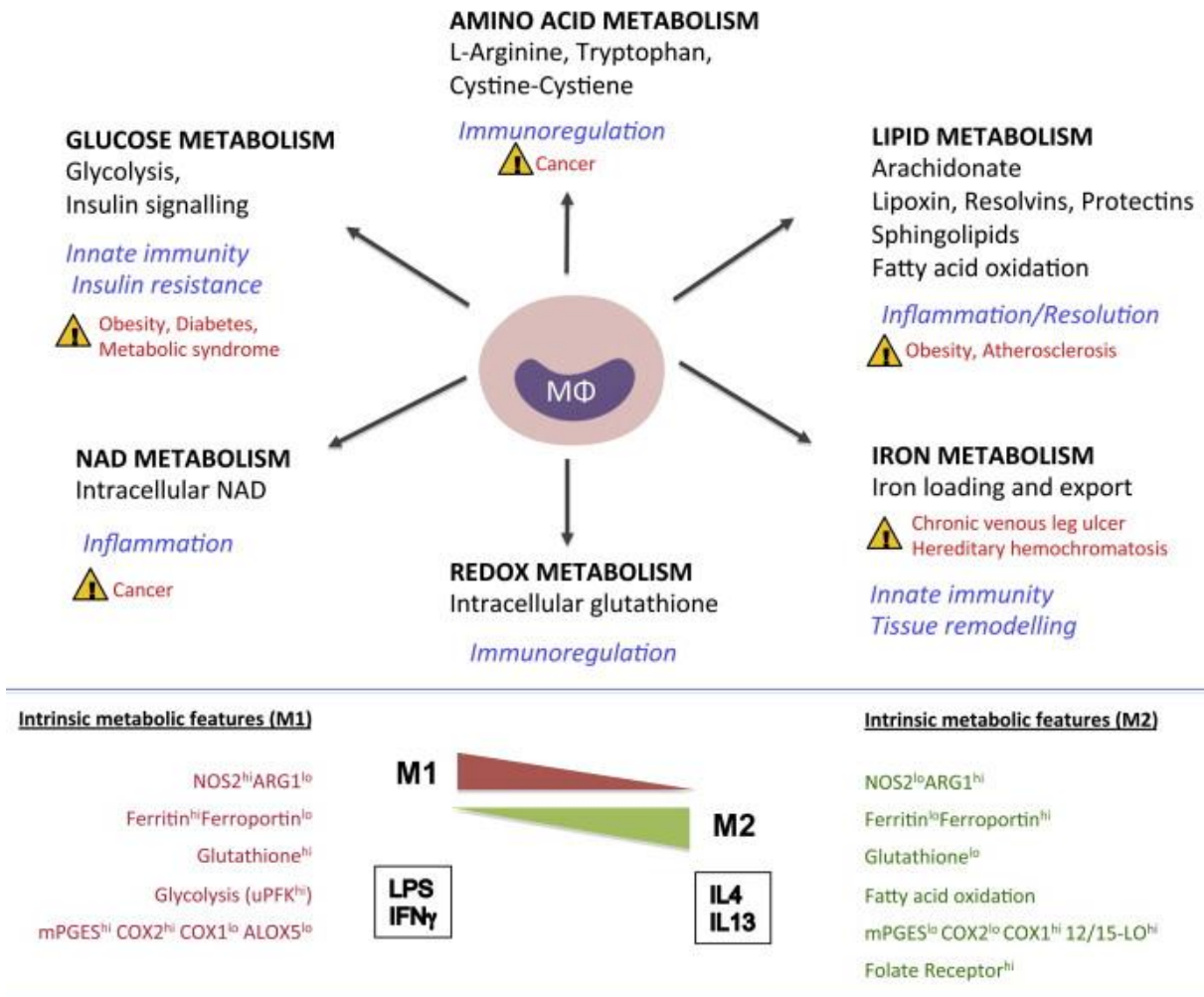


Figure 6 : Rôle de la polarisation M1/M2 dans la modulation du métabolisme cellulaire des macrophages [80]

#### 4.1. Métabolisme de l'arginine

L'arginine est métabolisée au sein de la cellule par l'oxyde nitrique synthase (NOS). Outre l'apport alimentaire, l'arginine provient de la dégradation des protéines cellulaires ou de la production endogène à partir d'un précurseur, l'arginosuccinate [82], [83]. Le métabolisme de la L-arginine (L-Arg) est ensuite régulé dans les macrophages par deux enzymes : l'oxyde nitrique synthase 2 (NOS2 ou iNOS) et l'arginase-1 (Arg-1) [80]. L'expression de ces enzymes est étroitement régulée par des signaux inflammatoires provenant de l'environnement où ils se trouvent.

La NOS2 est exprimée de manière inductible en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et le LPS [84]. Le pouvoir microbicide des macrophages M1 est lié à une stimulation d'enzymes comme l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui produit un radical libre, le NO [85]. L'activation d'iNOS dans les macrophages M1 est responsable de la production des RNI (intermédiaires azotés réactifs) impliqués, tout comme les ROI (espèces réactives de l'oxygène), dans l'activité microbicide des macrophages. Pour éviter une cytotoxicité induite par excès de NO, l'Arg-1 redirige le métabolisme de la L-Arg vers la production d'ornithine et de polyamine, ce qui bloque la voie de l'iNOS et donc l'activité antimicrobienne des macrophages [36]. Pour produire plus efficacement du NO, ou lorsque l'arginine est limitée, la citrulline est réutilisée pour synthétiser le NO via le cycle citrulline-NO par deux enzymes: l'argininosuccinate synthase (ASS1) et l'argininosuccinate lyase (ASL) (Figure 7) [84].

L'expression d'Arg-1 est stimulée dans les cellules myéloïdes par les cytokines Th2. Ces cytokines IL-4 et IL-13 activent STAT6 qui avec d'autres facteurs de transcription tels que STAT3 et la protéine de liaison CCAAT/enhancer  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) activent la stimulation de Arg-1 dans les macrophages M2. Dans les macrophages M2, Arg-1 produit de l'ornithine et de l'urée. L'ornithine est le précurseur de la production de polyamines par la voie de l'ornithine décarboxylase (ODC) ainsi que de la production de proline par l'enzyme ornithine aminotransférase (OAT). Elle permet la synthèse de citrulline grâce à l'ornithine transcarbamylase (OTC) et la carbamoyl phosphate synthétase (CPS) (Figure 7). Alors que les polyamines régulent essentiellement la prolifération et la différenciation des cellules, la proline est essentielle à la synthèse du collagène, indispensable dans la cicatrisation des plaies [82], [84], [86]–[88].

L'activité M1 inhibe la prolifération cellulaire et endommage les tissus via les ROS, tandis que l'activité M2 favorise la prolifération cellulaire et la réparation des tissus. NO et l'ornithine sont les deux principales molécules responsables de ces activités [89]. Cependant, des études contradictoires ont montré que l'absence d'ornithine par inactivation d'Arg-1 provoque un retard de réparation des tissus sans pour autant altérer totalement ses capacités [90].

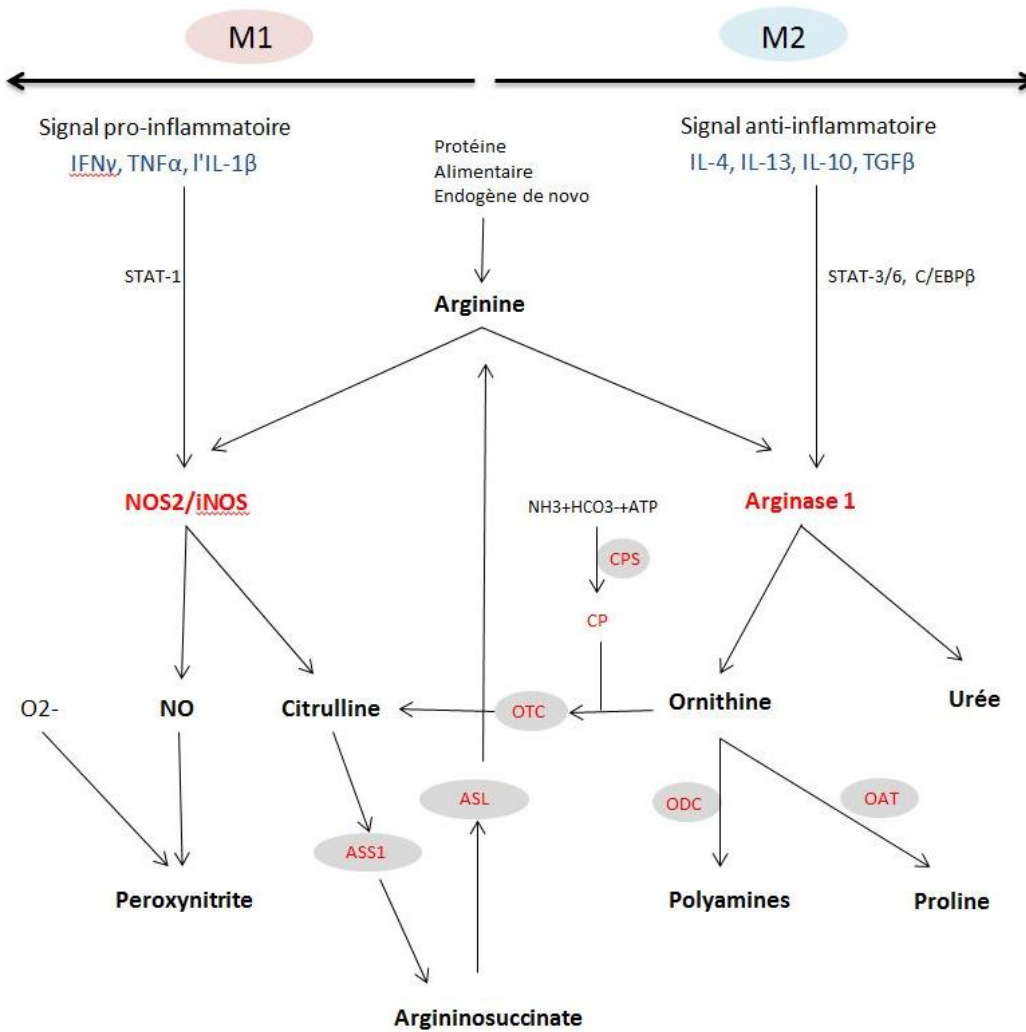


Figure 7 : Représentation schématique simplifiée du métabolisme de l'arginine; CP, phosphate de carbamoyle

## 4.2. Le métabolisme de l'oxygène

En réponse aux agents infectieux, les ROS jouent un rôle fondamental dans la destruction rapide des micro-organismes. Dans l'organisme, il existe plusieurs sources de ROS parmi lesquels la xanthine oxydase et la NADPH oxydase. La surconsommation d'oxygène conduit à la formation d'intermédiaires potentiellement toxiques tel que l'anion peroxyde  $O_2^-$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Figure 8).

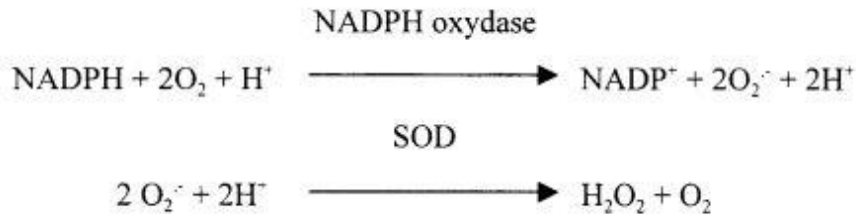


Figure 8 : Synthèses des différentes formes de ROS ; SOD : Superoxyde dismutase

La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate synthase NADPH oxydase (NOX) catalyse la réduction univalente de l'oxygène en superoxyde, une espèce oxydante et précurseur de molécules antimicrobiennes citées précédemment. Sept isoformes de NOX ont été à ce jour identifiées (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 et Duox2) [91]. Les NOX participent à un large éventail de processus cellulaires, comme l'apoptose, la défense de l'hôte, la transduction du signal cellulaire, la détection d'oxygène ainsi que l'angiogenèse [92].

Les ROS jouent également un rôle important dans la régulation des voies de transduction du signal et de l'expression génétique. Ils sont essentiels à la différenciation des macrophages [93]. Trois protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), ERK, JNK et p38, sont activées après un traitement par GM-CSF ou M-CSF et sont impliquées dans la différenciation monocyte-macrophage. Lorsque la production de ROS est empêchée, l'activation de ces voies de signalisation est partiellement inhibée [93].

Il a été observé que l'élimination des ROS par l'hydroxyanisole butylé (BHA) et d'autres inhibiteurs de ROS bloquait complètement la différenciation monocyte/macrophage des monocytes primaires humains. Le BHA bloque spécifiquement l'activation de ERK au stade précoce de la différenciation des macrophages ce qui impacte la polarisation en macrophages M2 mais pas en macrophages M1 [93], [94].

La production NADPH dans les macrophages M1 leur confère un pouvoir bactéricide [95]. Les études menés par Xu *et al* dans des MDM murins montrent que la perte de NOX1 et de NOX2 réduit efficacement l'activité de NADPH, entrave la différenciation des monocytes en macrophages et est essentielle à la polarisation des macrophages M2 mais non de type M1 [91]. Dans les macrophages M1 on observe une augmentation significative de l'expression et de l'assemblage de la NADH synthase [96]. Il a été démontré une différence d'expression des ROS dans les sous-ensembles de macrophages polarisés M2. Les sous-ensembles M2 et M2c dérivés de monocytes humains ont une capacité de production de ROS supérieure à celle de M2a probablement liée à la sous expression du complexe protéique glycosylé gp91<sup>phox</sup> de la NADH synthase [97], [98].

### **4.3. Métabolisme du glucose et cycle de Krebs**

Une différence de régulation du métabolisme du glucose, du cycle de krebs et de la voie des pentoses phosphate est aussi observée dans les deux populations. Les macrophages polarisés M1 s'orientent vers la glycolyse anaérobie, plus adaptée pour répondre aux besoins énergétiques [99], à la lutte contre l'infection ce qui implique une augmentation de l'absorption du glucose ainsi que la conversion du pyruvate en lactate (Figure 9). Des études ont démontré que les macrophages M1 induits par le LPS présentaient également une augmentation de la glycolyse, une diminution de la consommation d'oxygène et de l'activité de la chaîne respiratoire [100]–[102]. L'activation des macrophages par le LPS entraîne une augmentation de la production de lactate et une production accrue de produits intermédiaires du cycle de Krebs tels que le succinate, le malate ou le citrate [103], [104].

Le pyruvate formé pendant la glycolyse est décarboxylé en acétylCoA par l'intermédiaire de la pyruvate déshydrogénase qui constitue le point de départ du cycle de Krebs. Dans un premier temps, l'acétylCoA réagit avec l'oxaloacétate pour donner du citrate, grâce à la citrate synthase. Le citrate va ensuite être transformé en isocitrate par l'aconitase. L'isocitrate va être décarboxylé puis oxydé pour donner l'alpha-cétoglutarate. Ce dernier subit une décarboxylation pour produire du succinate. Le succinate subit une déshydrogénation par la succinate déshydrogénase pour produire du fumarate. Le fumarate va être hydraté en malate qui est la forme ionisée de l'acide malique par la fumarate déshydrogénase. Le malate sera ensuite oxydé en oxaloacétate par la malate déshydrogénase. L'oxaloacétate, le substrat de départ est ainsi régénéré et prêt pour un nouveau cycle. Une seule molécule d'ATP est directement générée par le cycle de Krebs. La majeure partie de l'énergie produite est stockée



sous la forme des coenzymes réduites NADH et FADH<sub>2</sub> qui peuvent entraîner la production de grandes quantités d'ATP dans les réactions ultérieures de la chaîne de transport des électrons et de la phosphorylation oxydative [104], [105].

Dans les macrophages activés par du LPS ou de l'IFN $\gamma$  une baisse de l'expression des enzymes isocitrate déshydrogénase (IDH) et succinate déshydrogénase (SDH) est observée ; d'où l'augmentation du citrate et du succinate [83].

Le succinate s'est avéré être le moteur de la production de la cytokine inflammatoire IL-1 $\beta$  à travers HIF1 $\alpha$  qui lui est une protéine hétérodimérique composée de deux sous-unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Trois isoformes de la sous-unité sensible à l'oxygène  $\alpha$  ont été identifiées. L'isoforme HIF1 $\alpha$  s'exprime de façon ubiquitaire et est étroitement liée à la réponse inflammatoire et aux activités microbicides. L'expression de HIF1 $\alpha$  est contrôlée par l'intermédiaire de NF- $\kappa$ B, ce qui entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs du phénotype M1, comme les enzymes glycolytiques et les transporteurs du glucose [86].

La kinase glucidique (CARGL) est une kinase immunorégulatrice impliquée dans le métabolisme du glucose. CARGL antagonise la production de cytokines régulées par le NF- $\kappa$ B (TNF $\alpha$ , IL-6, NO et IL-12) induite par le LPS dans les macrophages M1. L'expression de CARGL est diminuée *in vitro* et *in vivo* par stimulation LPS chez la souris et l'Homme [106]. En utilisant un marqueur de <sup>13</sup>C-1,2-glucose, Haschemi *et al* ont montré que le LPS favorisait la voie glycolytique et la voie des pentoses phosphate, entraînant une augmentation de la production du ribose-5 phosphate (R5P), du xylulose-5-phosphate (X5P) et du sédoheptulose-7-phosphate (S7P) [106]. L'effet négatif de l'activité de CARGL sur la fonction des macrophages M1 a soulevé la possibilité que des changements dans le métabolisme du glucose puissent influencer les propriétés inflammatoires des macrophages M1.

La glycolyse dans le phénotype M1 est la principale voie de production de l'ATP et du NADH et sur cette base, la production de lactate est augmentée dans le milieu intra et extracellulaire. La transformation d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate génère un gain énergétique avec production de deux molécules d'ATP et de deux molécules de NADH. La voie des pentoses phosphate est cruciale pour la production de NADPH. Le NADH est nécessaire à la production de ROS par la NADPH-oxydase. Le NADPH est aussi utilisé, avec l'arginine et l'O<sub>2</sub>, pour produire du NO par activation d'iNOS [102] et réduire le glutathion qui joue un rôle crucial pour minimiser les altérations auto-oxydantes des ROS [107].

En résumé, la polarisation M1 est caractérisée par une amélioration de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates ainsi que par une diminution de la phosphorylation oxydative (Figure 9).

Les macrophages M2, par contre, tirent une grande partie de leur énergie de l'oxydation des acides gras et du métabolisme oxydatif. Après activation des macrophages par l'IL-4, ils peuvent induire l'expression de constituants de la chaîne de transport d'électrons qui vont effectuer la phosphorylation oxydative et entraîner le pyruvate dans le cycle de Krebs (Figure 9). L'activation des macrophages par IL-4 entraîne une cascade de processus métaboliques oxydatifs allant de l'oxydation des acides gras à la phosphorylation oxydative qui produit 36 molécules d'ATP [86], [104]. L'inhibition de la phosphorylation oxydative altère la polarisation M2 dans un modèle de BMDM murin [102]. Après l'activation, le facteur de transcription responsable de la médiation des réponses transcriptionnelles (STAT6) est activé. STAT6 active à son tour une protéine co-activatrice PGC-1 $\beta$  qui stimule la protéine peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ). PGC-1 $\beta$  améliore la respiration mitochondriale ainsi que la biogenèse mitochondriale. Les macrophages activés alternativement déclenchent un programme métabolique incluant la chaîne de transport des électrons ainsi que l'oxydation des acides gras par  $\beta$ -oxydation. Ceci est orchestré par STAT6 et PGC-1 $\beta$ . PGC-1 $\beta$  est considéré comme l'acteur clé responsable du changement métabolique des macrophages M2. L'inhibition de PGC-1 $\beta$  altère la différenciation des macrophages en M2 mais aussi leurs fonctions (Figure 10) [108].

Arg-1 est également le moteur de la production de polyamines et d'ornithine. Les principales conséquences fonctionnelles sont la réparation des tissus et les réponses antiparasitaires [86]. Dans cette population, il a été observé une augmentation des métabolites (nucléotide-ose) caractérisée par des quantités élevées de UDP-N-acetyl-alpha-D-glucosamine (UDP-GlcNAc) [105]. Des concentrations élevées d'UDP-glucose et de UDP-glucuronate caractérisent cet état de polarisation M2. Le métabolisme lié à la glutamine/glutamate et à la biosynthèse UDP-GlcNAc sont essentiels à la polarisation M2. UDP-GlcNAc est un donneur de sucre pour la N-glycosylation et ce dernier est crucial pour l'activation des macrophages M2, puisque les récepteurs lectine/mannose hautement glycosylés sont les marqueurs les plus typiques de la polarisation M2 [102].

Dans la polarisation M2 le cycle de Krebs n'est pas spécialement altéré, il y a une augmentation de la phosphorylation oxydative, une diminution de la voie des pentoses phosphates et de CARKL [106].

Cependant, des études ont montré que la polarisation pouvait être réversible passant d'un phénotype à l'autre en fonction de l'environnement [102]. Bossche *et al* montrent la capacité des macrophages M2 à se repolariser facilement en M1 inflammatoires tandis que les macrophages M1 murins et humains ne parviennent pas à se convertir en cellules M2 après exposition à l'IL-4 *in vitro* et *in vivo*. L'activation des macrophages en M1 inhibe la phosphorylation oxydative et empêche la repolarisation de ces macrophages en M2 [109].

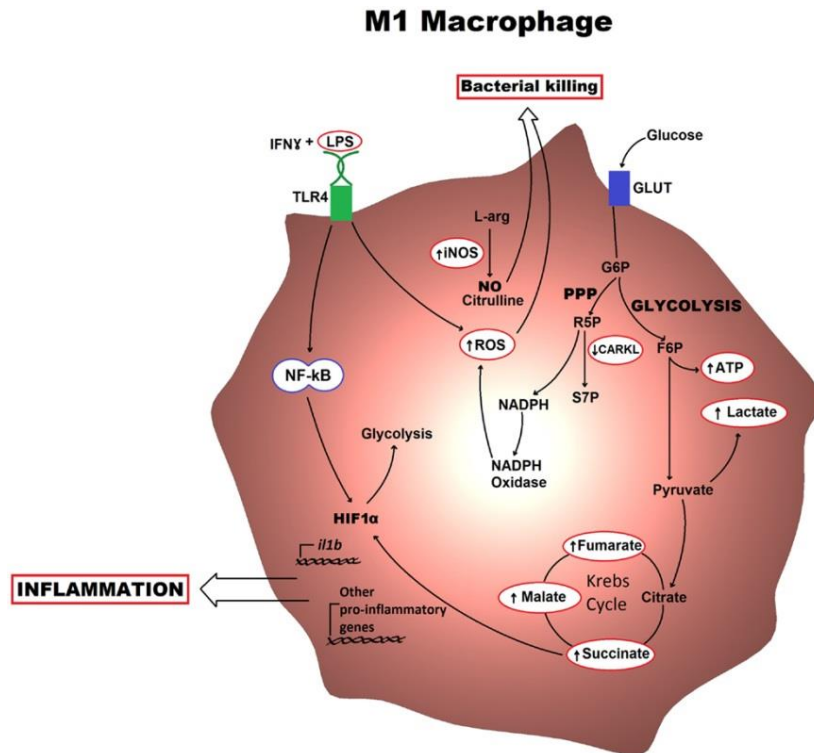


Figure 9 : Profil métabolique d'un macrophage M1 [86]

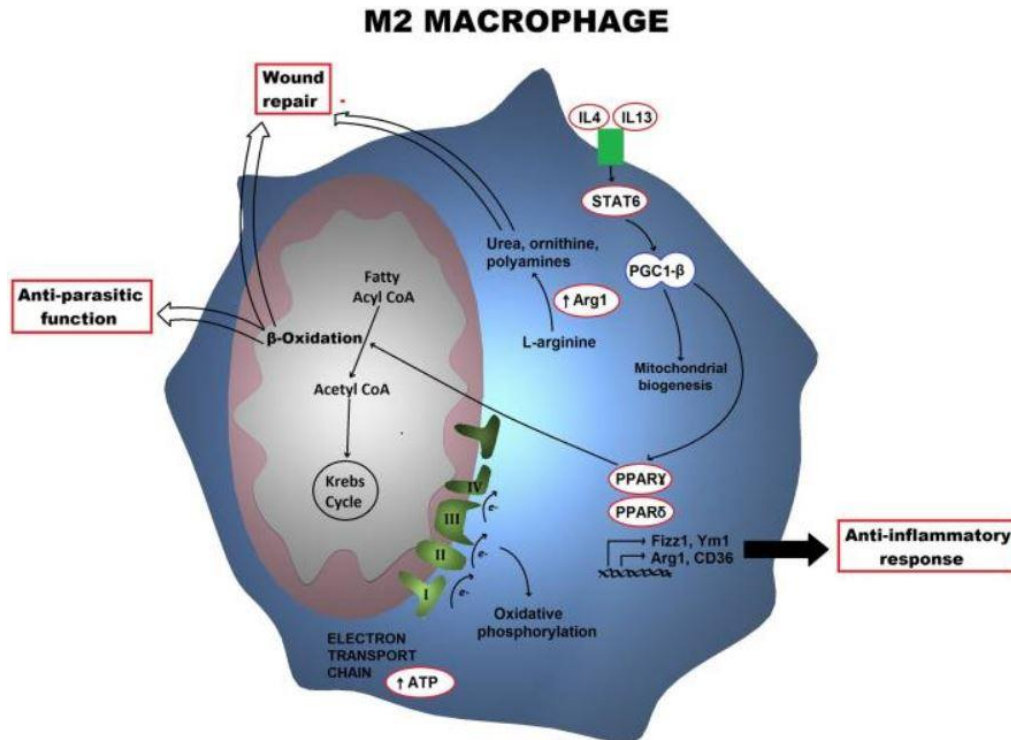


Figure 10 : Profil métabolique d'un macrophage M2 [86]

#### 4.4. Le métabolisme lipidique

Le métabolisme des lipides contribue également à la phagocytose des macrophages en répondant à leurs besoins énergétiques et en régulant la fluidité membranaire nécessaire à ce processus [80]. La synthèse des acides gras est liée aux fonctions effectrices pro-inflammatoires des macrophages M1. L'oxydation des acides gras est elle liée aux macrophages M2 [104], [110].

La polarisation des macrophages humains a été associée à une régulation différentielle des médiateurs sphingolipidiques, de la sphingosine et des céramides kinases [80].

Les médiateurs des sphingolipides, comme la sphingosine-1-phosphate (S1P), le céramide-1-phosphate (C1P) et la sphingosine, sont dérivés de la dégradation enzymatique de la sphingomyéline. Ils sont impliqués dans la régulation de quelques fonctions cellulaires comme la prolifération cellulaire, la phagocytose, la différenciation, l'angiogenèse, la chimiotaxie et la survie cellulaire. Les S1P et C1P sont impliqués dans la synthèse des

eicosanoïdes, de cyclooxygénase-2 et de la phospholipase cytosolique A2 du groupe IVA (cPLA2 $\alpha$ ). Cette étude montre que ces deux métabolites sphingolipidiques agissent de façon combinée pour réguler la production des eicosanoïdes, importants médiateurs inflammatoires [111].

L'acide arachidonique présent dans les phospholipides membranaires est un précurseur des eicosanoïdes qui sont des produits d'oxygénation d'acides gras polyinsaturés.

Le 5-lipoxygénase, 2-lipoxygénase et 15-lipoxygénase sont des lipoxygénases humaines qui métabolisent l'acide arachidonique. Les lipoxygénases produisent des leucotriènes (LT), des acides hydroperoxyéicosatétraénoïques (HPETE), des acides hydroxyéicosatétraénoïques (HETE) et des acides hydroxyoctadécadiénoïques (HODE). [112]

La 15-lipoxygénase (15-LOX) existe sous deux isoformes, la 15-lipoxygénase de type 1 (15-LOX-1) et de type 2 (15-LOX-2), codés respectivement par les gènes arachidonate 15-lipoxygénase (ALOX15) et l'arachidonate 15-lipoxygénase de type B (ALOX15B) situés sur le chromosome 17 et dont l'expression est retrouvée dans les MDMs humains et les macrophages alvéolaires humains. Des études menés par Wuest *et al* montrent qu'ALOX15B est augmenté lors de la différenciation des monocytes en macrophages, alors que l'expression de l'ALOX12 et de l'ALOX15 n'est pas modifiée [113]. ALOX15B est la lipoxygénase principalement exprimée dans les macrophages humains et son expression est augmentée par l'IL-4 et le LPS. L'IL-4 et l'IL-13 augmentent également l'expression de l'ALOX15, mais seule la stimulation par l'IL-4 semble conduire l'expression de l'ALOX15 à des niveaux supérieurs à l'expression basale de l'ALOX15B [113].

L'analyse transcriptionnelle a révélé un profil de régulation différent des enzymes de cyclooxygénase 1 (COX1) et de cyclooxygénase 2 (COX2) impliquées dans la production d'eicosanoïdes. L'action des COX-1 et COX-2 aboutit à la formation des prostaglandines.

COX-1 est codée par le gène PTGS1 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1) dont l'expression permet la synthèse immédiate en quelques minutes des prostanoïdes. À l'inverse, l'expression de COX-2 codée par le gène PTGS2 est dite inductible par l'action de stimuli inflammatoires et agit au bout de quelques heures. La régulation synergique des facteurs de transcription STAT1 et STAT3 régule respectivement le métabolisme des glycérolipides et des eicosanoïdes. Les macrophages M1 activés par IFN- $\gamma$  /LPS ont montré une augmentation de l'expression de COX2 avec inhibition de COX1, de la leucotriène A4 hydrolase, de la

thromboxane A synthase 1 et de l'arachidonate 5-lipoxygénase (ALOX5). Les macrophages activés par l'IL-4 montrent une augmentation d'ALOX15 et de la COX1.

L'ensemble des études montrent une régulation opposée des sphingosines et des céramides kinases, respectivement exprimées dans les macrophages M1 et M2. Ces enzymes peuvent aider à distinguer le type de phénotype des macrophages. La sphingosine est exprimée dans les macrophages M1 et la céramide kinase est exprimée dans les macrophages M2 [101], [114].

Du LPS [103] ou du LPS+IFN $\gamma$  [83] sont souvent utilisés pour polariser les macrophages en phénotype M1 et du IL-4 pour polariser les macrophages en phénotype M2. L'effet du stimulus utilisé pour la polarisation en M1 sur les métabolites a été examiné par Rattigan *et al* en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse [115]. Les études menées dans un modèle murin pour comparer la stimulation mono- et la stimulation combinée dans des macrophages dérivés de la moelle osseuse montre des profils d'intensité différents des métabolites en fonction du stimulus utilisé. En effet, Rattigan *et al* montrent que la diversité des différentes voies de signalisation des TLR peut entraîner des profils immunométaboliques différents. Les intensités de certains métabolites liés au métabolisme de la pyrimidine ont été mesurées. En fonction des stimuli, des niveaux d'expressions de la  $\beta$ -alanine, du Ncarbamoyl-L-aspartate, du L-orotate, de l'uridine et de l'uracile ont été observés entre les macrophages actives par du LPS, de l'INF- $\gamma$  ou les deux ensembles et des macrophages M0 non polarisés (Figure 11) [115].

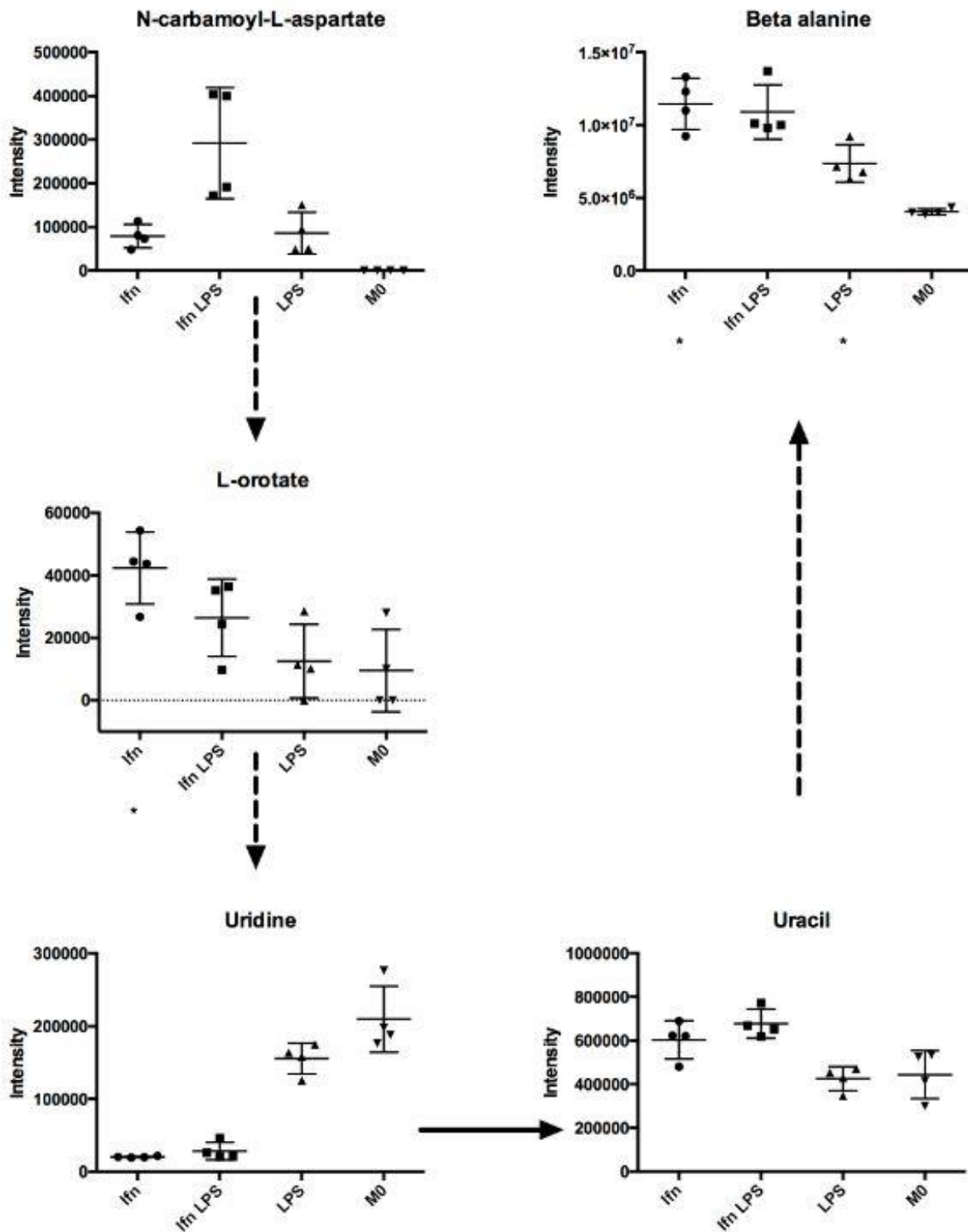


Figure 11 : Mesure des métabolites appartenant au métabolisme pyrimidique en fonction de différents types de stimuli [115]

Ainsi, en réponse à des signaux micro-environnementaux, les macrophages peuvent modifier profondément leur profil métabolique.

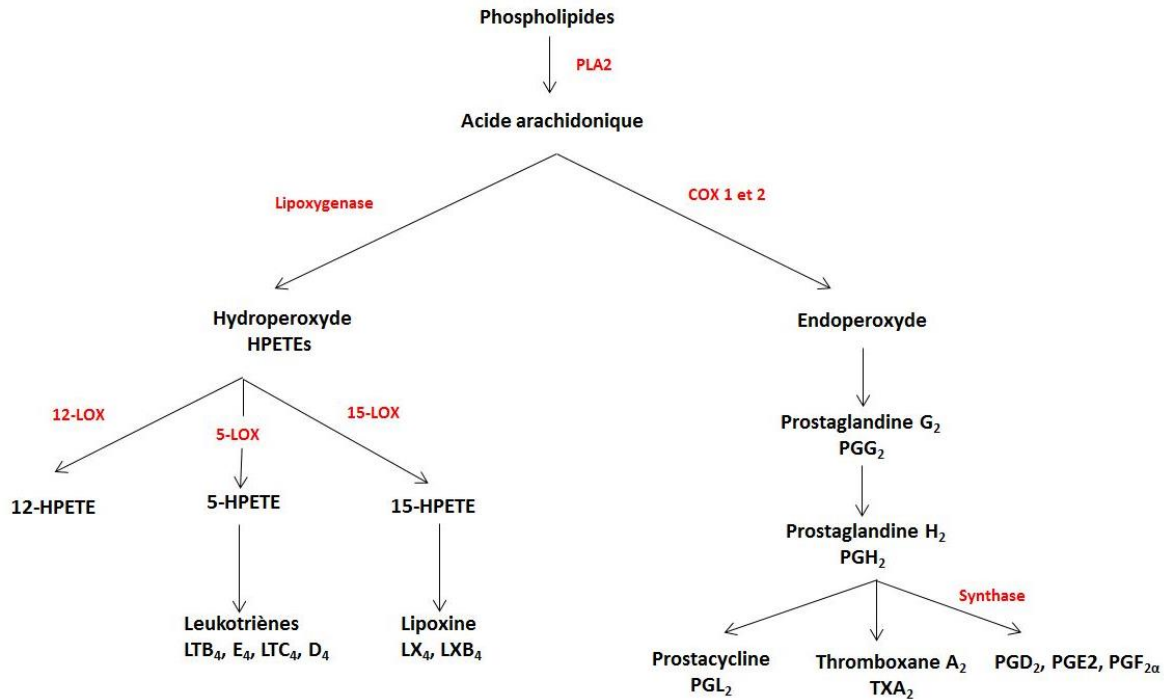


Figure 12 : Voie de l'acide arachidonique

Plusieurs études ont été menées pour étudier le métabolisme lipidique des macrophages polarisés M1 et M2 sur des MDM et sur des modèles murins. Peu d'études ont été faites sur les métabolites de macrophages pulmonaires humains.

L'étude transcriptomique des gènes codants pour les macrophages pulmonaires humains a été effectuée par Abrial *et al* (UPRES EA220). Le métabolisme lipidique est connu pour la régulation différentielle de la production de sphingolipides, de ceramides kinases, de dérivés de l'acide arachidonique ou de l'oxydation des acides gras au cours de la polarisation M1 et M2 [80], [110], [111], [113], [114].

L'analyse du transcriptome a été faite dans le but d'identifier l'ensemble des gènes qui pourraient être impliqués dans la polarisation M1 et M2. La comparaison des macrophages témoins par rapport aux macrophages cultivés avec du LPS, de phénotype M1 montre 3552 gènes régulés de façon différentielle dont 1610 où l'expression est augmentée et 1942 où l'expression est baissée. Les cellules stimulées avec de l'IL-4 et l'IL-13, de phénotype M2 présentent 591 gènes modifiés en comparaison avec les macrophages témoins, l'expression de 281 gènes est augmentée en comparaison aux témoins et baissée dans les 310 autres gènes. Seuls 76 gènes étaient modifiés à la fois dans le phénotype M1 et dans le phénotype M2 (Figure 13).



Des différences ont été trouvées au niveau des gènes codant pour les cytokines, des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et des protéines membranaires. La RT-qPCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. La cartographie RT-qPCR complète des gènes codant pour les protéines des voies de la lipoxigénase et de la cyclooxygénase montre des différences de régulation des gènes en fonction du phénotype. Les travaux ont montré que les gènes les plus affectés étaient ceux codant pour la cyclooxygénase 2 (PTGS2), la prostaglandine E synthase (PTGES) et le récepteur de la prostaglandine I2 (PTGIR), qui étaient respectivement 494-, 2074- et 60-fois plus exprimés par le LPS. En revanche, l'IL-4 et l'IL-13 ont eu peu d'impact sur cette voie avec une expression diminués de PTGES et du PTGIR de 5 et 29 fois respectivement.

Pour la voie lipoxigénase, le seul gène régulé à la hausse était celui codant pour la 15-lipoxigénase (ALOX15) qui était 155 et 46 fois plus élevé avec IL-4 et IL-13 respectivement, alors que les gènes codant pour la leucotriène C4 synthase (LTC4S), leucotriène A4 hydrolase (LTA4H) et cysteinyl leukotriène récepteur 1 (CYSLTR1) étaient 5 à 10 fois moins exprimés par le LPS.

La 15-LOX qui est liée à l'inflammation et à la régulation immunitaire a aussi été étudié spécifiquement dans le but d'évaluer son rôle dans la régulation de la polarisation des macrophages pulmonaires humains. Les niveaux d'expression d'ALOX15 (15-LOX-1) et d'ALOX15B (15-LOX-2) ont été déterminés par RT-qPCR et il est apparu que dans un milieu LPS, ALOX15B était fortement exprimée tandis qu'en présence de IL-4/IL-13 ALOX15 est augmenté.

L'inhibition de 15-LOX a pour conséquence une baisse des cytokines M1 normalement produites en présence de LPS (CCL2, CCL3, CCL4, CCL4, CXCL1, CXCL8 et CXCL10) et des cytokines M2 normalement produites en présence d'IL-4/IL-13 (CCL13, CCL18 et CCL22). Cette observation suggère que les 15-LOX ont un rôle modulateur dans la polarisation des macrophages pulmonaires humains et donc dans la pathogenèse des troubles pulmonaires inflammatoires.

Pour les cytokines et les protéines membranaires, les différences ont été confirmées en faisant des tests ELISA et de la cytométrie en flux. Les différences observées pour les gènes codant pour le métabolisme (lipidique ici) n'ont pas été étudiées à l'échelle des métabolites.

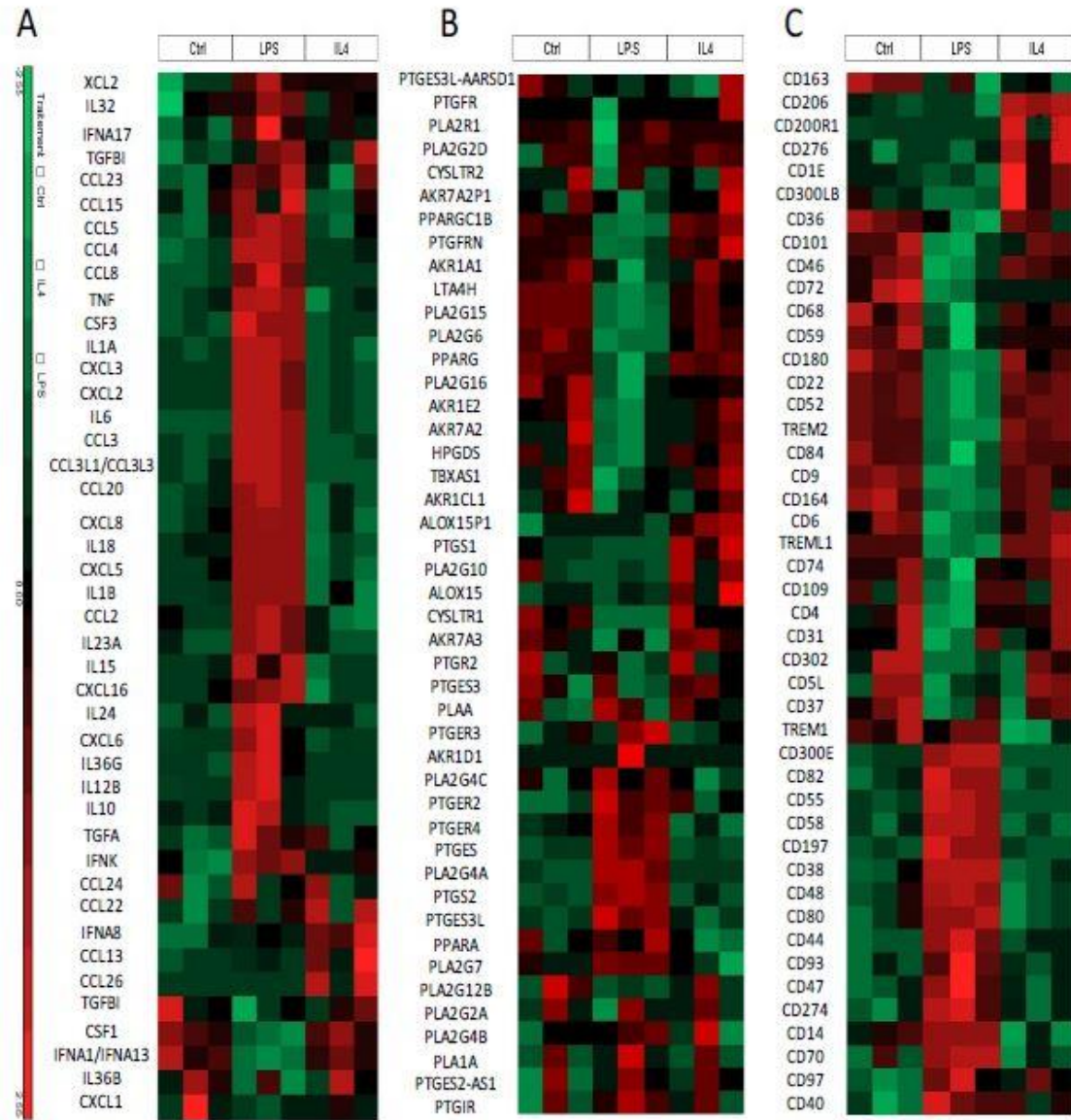


Figure 13 : Heatmaps représentant l'expression des transcrits des gènes de cytokines (A), du métabolisme lipidique (voie de l'acide arachidonique) (B) et des protéines membranaires (C) qui ont été trouvés exprimés différemment entre les macrophages pulmonaires humains témoins, traités par LPS et traités par IL-4. Les résultats ont été obtenus avec des macrophages de trois donneurs indépendants cultivés pendant 24 heures. Une échelle de couleur rouge-vert représente les niveaux d'expressions normalisés (rouge : élevés, vert : bas).

#### 4.5. Voies des kynurénines

Le tryptophane est un acide aminé essentiel à la synthèse protéique. Il est également le substrat de la voie de synthèse de la sérotonine et la voie des kynurénines. La dégradation du tryptophane grâce à une série de réactions catalysées par plusieurs enzymes conduit à plusieurs métabolites qui constituent le groupe des kynurénines. La voie des kynurénines a longtemps été considérée comme la voie de synthèse unique du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) cofacteur essentiel à plusieurs fonctions cellulaires[116].

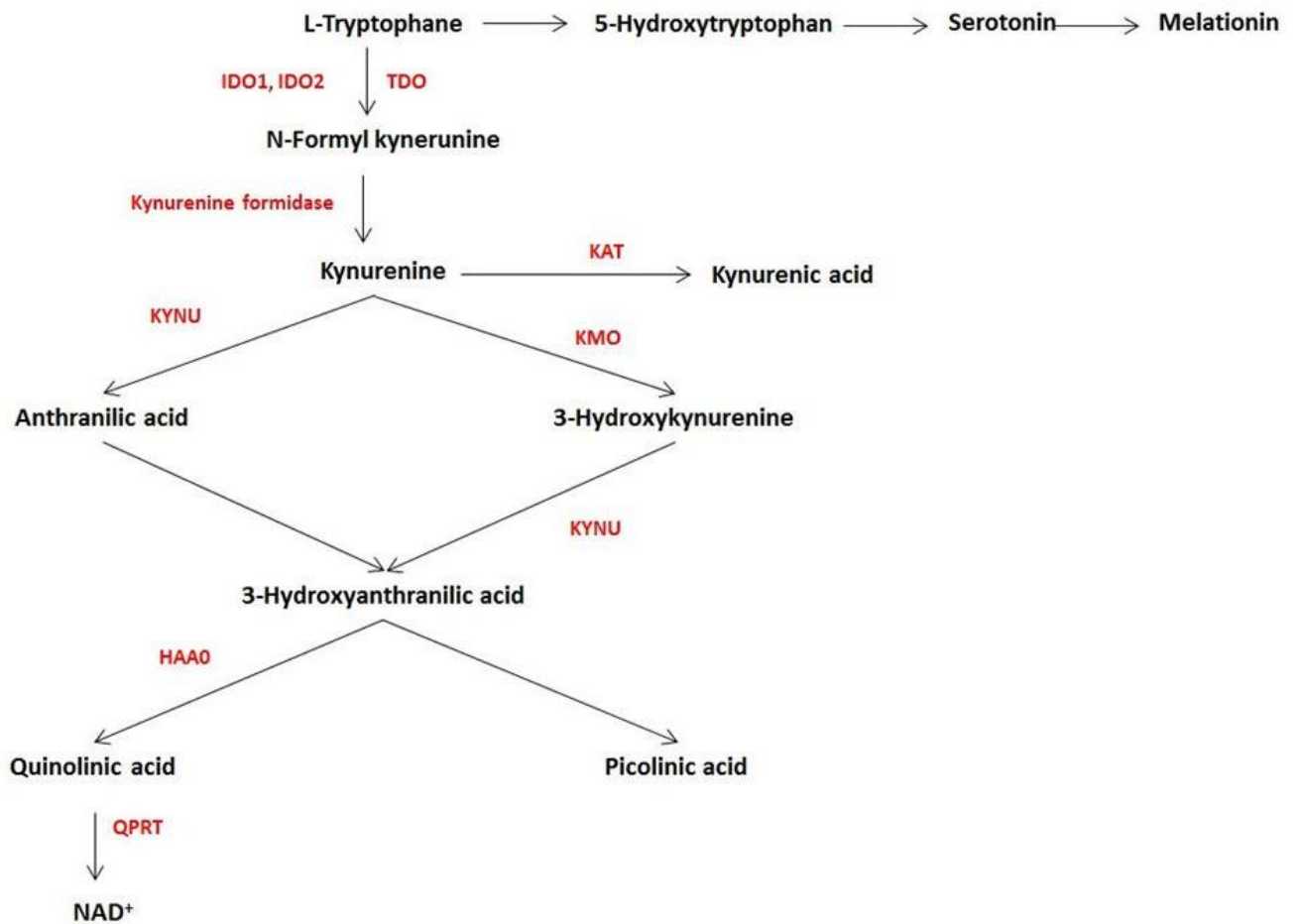


Figure 14 : Voie métabolique des kynurénines

La première réaction de synthèse du formyl kynurénine à partir du tryptophane se fait sous l'action de trois enzymes : la tryptophane 2,3 di-oxygénase (TDO), l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) de type 1 et 2.

Le formyl kynurénine sous l'action de l'enzyme kynurénine formamidase est transformé en kynurénine. La kynurénine est métabolisée en acide kynurénique par l'enzyme kynurénine aminotransférase (KAT), soit en 3-hydroxy-kynurénine par la kynurénine-3-monooxygénase (KMO). Sous l'action des kynurénases, une partie de la kynurénine est convertie en acide anthranilique puis en acide 3-hydroxyanthranilique et le 3-hydroxykynurénine métabolisé en acide 3-hydroxyanthranilique. L'acide 3-hydroxyanthranilique peut être transformé en acide picolinique ou en acide quinolinique. La réaction de synthèse de l'acide quinolinique est catalysée par l'acide 3-hydroxyanthranilique oxygénase. L'acide quinolinique est le précurseur de synthèse de  $\text{NAD}^+$  sous l'action de l'acide quinolinique phosphoribosyltransferase (Figure 14) [117], [118].

La TDO est fortement exprimée dans le foie et faiblement dans le tissu cérébral [119]. L'IDO2 se trouve dans le rein, le foie ou le tissu cérébral, le placenta et quelques tissus tumoraux. Elle est également exprimée de manière constitutive dans les cellules dendritiques (CD) [120]. L'IDO1 est exprimée dans les cellules épithéliales, les macrophages et les CD induites par les cytokines pro-inflammatoires telles que  $\text{TNF-}\alpha$  ou  $\text{IFN-}\gamma$  [121]. L'IDO inhibe la production de cytokines proinflammatoires par les monocytes/macrophages et promeut leur apoptose *in vitro* [122].

Il a été démontré dans des modèles de cancers murins que l'IDO1 et la TDO étaient fortement exprimées dans les cellules présentant des antigènes comme les cellules dendritiques, entraînant une forte baisse du niveau de tryptophane. La carence en tryptophane prédispose les lymphocytes T activés à l'apoptose [123].

Une étude sur un modèle de MDM humains montre que le traitement par le LPS entraîne une baisse de l'expression des gènes codant pour les enzymes métaboliques de la voie des kynurénines et de ses dérivés (IDO, KMO). Le LPS entraîne une baisse du taux de tryptophane allant de 70 à 80% dans les échantillons et simultanément une augmentation de la kynurénine. Le traitement par l' $\text{IFN-}\alpha$  produit les mêmes effets que le traitement par LPS avec une intensité moindre [124].

Lim *et al* montrent que sur des modèles MDM d'humains et de macaques, le traitement avec de l' $\text{IFN-}\gamma$  entraîne une dégradation du tryptophane passant de  $47,68 \pm 5,37 \mu\text{M}$  à  $t=0$  à  $6,13$

$\pm 3,49 \mu\text{M}$ ,  $7,51 \pm 4,51 \mu\text{M}$ , et  $3,49 \pm 0,79 \mu\text{M}$  à  $t = 24\text{h}$ ,  $48\text{h}$  et  $72\text{h}$  respectivement. La concentration de kynurénine passe de  $6,99 \pm 0,77 \mu\text{M}$  à  $26,88 \pm 3,29 \mu\text{M}$ ,  $44,78 \pm 4,68 \mu\text{M}$  et  $52,47 \pm 6,65 \mu\text{M}$  sur 24, 48 et 72 h respectivement.

Pour l'acide quinolinique, les concentrations dans les MDM non stimulés sont égales à  $0,34 \pm 0,04 \mu\text{M}$ . La stimulation à l'IFN- $\gamma$  augmente la concentration d'acide quinolinique de  $0,87 \pm 0,11 \mu\text{M}$  à 24 h,  $1,38 \pm 0,17 \mu\text{M}$  à 48 h et  $2,05 \pm 0,26 \mu\text{M}$  à 72 h [125].

Une étude visant à déterminer si l'activité de l'enzyme IDO diffère entre des patients sains et des patients souffrants d'asthme allergique a montré que l'acide quinolinique était un bon marqueur de l'inflammation éosinophile locale en réponse à une infection au rhinovirus dans le condensant d'air expiré qui est une source prometteuse de biomarqueurs de maladies pulmonaires [126]. L'acide quinolinique exerce des effets cytotoxiques et est impliqué dans des troubles inflammatoires comme l'infection au VIH [127].

L'étude de IDO-1 et 2, première enzyme de cette voie dans des macrophages pulmonaires humains polarisés M1 et M2 montre qu'elle est exprimée en présence de LPS mais pas d'IL-4 [128]. Lee *et al* montrent que la délétion du gène *IDO* dans les lymphocytes T entraîne une inflammation pulmonaire mortelle aiguë connue sous le nom de syndrome de pneumonie idiopathique (IPS) [129]. Des travaux montrent que dans les infections par les virus (influenza virus) induit une expression d'IDO1 médiés par les interférons dans les macrophages primaires et dans les poumons de souris. La voie des kynurénine est activés dans les macrophages en réponse à une infection par des souches de grippe B, HSV1, HSV2, le VIH, le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C, le cytomégalovirus, *Chlamydia psittaci*, *Toxoplasma gondii* et *Leishmania donovani* [130].

La Kynunérine a été trouvé comme marqueurs de la mortabilité dans plusieurs pathologies pulmonaires (BPCO, pneumonie). Les dosages et corrélations ont été effectués essentiellement dans du plasma humain [131]–[133].

## V. Les oxystérols

De récents travaux ont mis en évidence les interactions entre le métabolisme du cholestérol et le système immunitaire. Martinez *et al* ont mis en évidence que la polarisation était associée à la régulation à la hausse de l'ATP-binding cassette A1 (ABCA1), le principal agent de contrôle de l'élimination du cholestérol tissulaire [114].

Les stérols régulent la fluidité et la perméabilité de la membrane cellulaire ainsi que les processus métaboliques associés aux membranes [134]. Selon leur source, les stérols naturels peuvent être divisés en stérols animaux, phytostérols ou fongistérols. Les cellules de mammifères contiennent du cholestérol et les cellules fongiques contiennent de l'ergostérol. Les phytostérols ne sont pas synthétisés chez les mammifères mais sont présents dans divers aliments. Ils comprennent principalement le stigmastérol, le sitostérol, le campestérol [135]. Dans l'industrie pharmaceutique, l'ergostérol est un précurseur de la vitamine D2 et des hormones stéroïdes. Le  $\beta$ -sitostérol (24 $\alpha$ -éthylcholestérol) représente 45 à 95 % du stérol total présent dans les plantes, le campestérol (24 $\alpha$ -méthylcholestérol) représente 30 % des stérols totaux des huiles de graines et le stigmastérol (D22, 24 $\alpha$ -éthylcholestérol) représente 25 % du stérol total des huiles de graines [134]. La cytotoxicité des oxyphytostérols a été étudiée dans une lignée cellulaire de macrophages murins. Le nombre de cellules, la teneur en protéines, l'absorption des lipides et l'activité des mitochondries déshydrogénases ont été évaluées après exposition à un mélange  $\beta$ -sitostérol/campérol (50/40) ainsi qu'à d'autres oxystérols (7-ketocholesterol, 7-ketocampesterol, 7 $\alpha$ -hydroxysitosterol...) de concentration égale à 200  $\mu$ g/mL pendant 120 h maximum. Les résultats montrent que les phytostérols oxydés inhibent la croissance des cellules et que les oxydes de  $\beta$ -sitostérol et de campestérol ont des profils de toxicité similaires à ceux des oxystérols [136], [137]. Il a été rapporté que les phytostérols réduisent l'absorption du cholestérol et donc baissent le niveau circulant de cholestérol ce qui pourrait également contribuer à la prévention du cancer et des maladies inflammatoires [136]. Dans un modèle murin de sclérose en plaque, des études ont démontré que les phytostérols retardent le développement de l'encéphalomyélite auto-immune de 55% en réduisant l'infiltration et l'activité inflammatoire des cellules immunitaires dans le système nerveux central des souris traitées. L'IL-10 anti-inflammatoire était augmentée de 10 %, tandis que le CCL2 pro-inflammatoire inhibé de 50 % par le traitement aux phytostérols. De plus, d'autres facteurs pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, et IFN- $\gamma$  sont diminués [138].

Liu *et al*, dans un modèle murin de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) ont montré que le traitement avec du  $\beta$ -Sitostérol à des concentrations de 5, 25 et 50  $\mu$ M baissait la polarisation M1 et favorisait la polarisation en phénotype M2. Dans les macrophages M1, les marqueurs iNOS, IL-1 $\beta$ , CD86 et MHCII sont réduits de 50,2, 47,1, 87,1 et 31,3 %, respectivement avec le traitement au  $\beta$ -Sitostérol. Dans les macrophages polarisés M2, l'expression d'Arg-1, de l'IL-10, du CD163 et du CD206 ont augmenté de 65,6, 107,4, 23,5 et 51,3%, respectivement lors du traitement au  $\beta$ -Sitostérol [139].

Un oxystérol est un stérol contenant une ou plusieurs fonctionnalités oxygénées supplémentaires et est formé par l'oxydation du cholestérol, de certains de ses précurseurs immédiats ou de ses analogues [134].

Des travaux ont montré les interactions entre le métabolisme et le système immunitaire. Ces oxystérols sont actifs par stimulation des récepteurs hormonaux nucléaires *liver X receptor* (LXR) ou par liaison aux *insulin-induced gene proteins* (INSIG). Les LXR jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et des acides gras en régulant positivement l'expression des gènes codant pour les protéines de transport des lipides, tels que ABCA1 [140]. Les protéines INSIG1 et INSIG2 sont impliquées dans la répression de l'adressage intracellulaire des *sterol response element-binding proteins* (SREBPs), protéines de régulation de la biosynthèse et de la capture du cholestérol. Même s'ils jouent un rôle dans l'élimination de l'excès de cholestérol, les récepteurs LXR régulent aussi l'expression des gènes qui ne sont pas liés à l'homéostasie du cholestérol, comme par exemple des gènes impliqués dans la production de cytokines ou dans la phagocytose [140].

L'excès de cholestérol étant nuisible pour les cellules, la voie de biosynthèse du cholestérol est étroitement liée à la voie permettant son élimination. La biosynthèse est faite à partir de l'acétyl-CoA (Figure 10) dont les gènes codants sont principalement régulés par le facteur SREBP2. L'acétyl-CoA utilisé pour la biosynthèse du cholestérol provient d'une réaction d'oxydation des acides gras ou du pyruvate dans les mitochondries [140].

Les étapes principales du processus de synthèse du cholestérol sont : La condensation de 3 acétyl-CoAs pour donner du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA), le l'HMG-CoA est ensuite réduit en mévalonate et la réaction est catalysé par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase. Le mévalonate subit une double phosphorylation pour donner du 5-pyrophosphoryl-mévalonate et ce dernier subit une décarboxylation catalysée par la diphosphomévalonate décarboxylase pour donner de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP).

Les molécules d'IPP sont converties en squalène et la réaction est catalysée par la farnésyl-diphosphate farnésyltransférase 1. Le squalène subit une cyclisation en deux étapes. Il est d'abord oxydé en 3,4 époxysqualène. L'époxysqualène subit une cyclisation pour former le lanostérol (1<sup>er</sup> stérol du cycle) par l'action de l'enzyme lanostérol synthase.



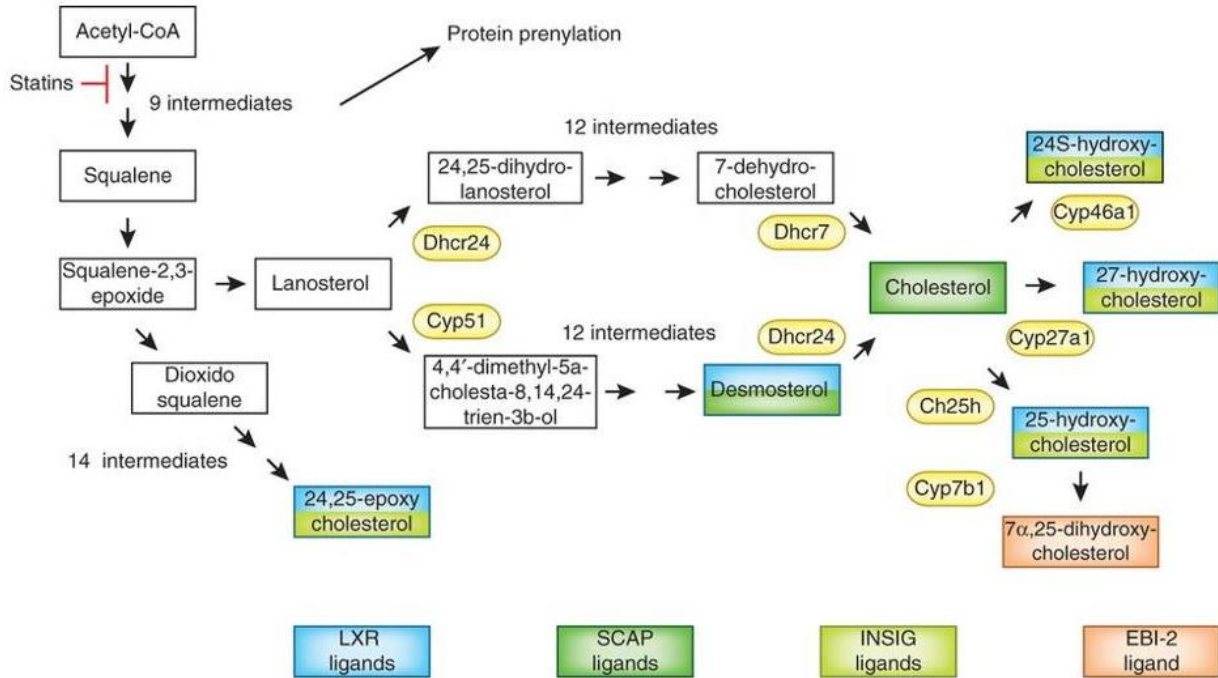


Figure 15 : Stérols et oxystérols biologiquement actifs [140]

Le lanostérol subit des hydroxylations pour donner du lathostérol et du desmostérol. Le lathostérol est alors converti en 7-dehydro-cholesterol puis en cholestérol. La réaction terminale de biosynthèse du cholestérol est catalysée par l'enzyme 7-déshydrocholesterol réductase codée par le gène (DHCR7). Le desmostérol est aussi converti en cholestérol et la réaction est catalysée par 24-déhydrocholesterol reductase codée par le gène (DHCR24) [140]–[142].

Le CYP51A1 est également appelé lanostérol-14 $\alpha$ -demethylase. Ce gène codant pour une enzyme de la famille du cytochrome P450 est la seule des huit qui est impliquée dans la biosynthèse du cholestérol. Elle catalyse l'élimination du groupement 14 $\alpha$ -méthyle du lanosthérol, ce qui entraîne la production d'oxystérols [143].

Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol qui comme le cholestérol possèdent 27 atomes de carbone et un noyau stérol commun. Ils résultent d'une oxydation du cholestérol qui peut se faire soit de manière chimique, soit de manière enzymatique [144]–[146]. Ils jouent un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol, le métabolisme des sphingolipides, l'agrégation plaquettaire, l'athérosclérose, ainsi que dans l'apoptose [147]. Plusieurs oxystérols majeurs apparaissent comme intermédiaires dans les voies de conversion du cholestérol en acides biliaires ou en hormones stéroïdiennes [144]. Les oxystérols ont des effets pro-inflammatoires, pro-apoptotiques et pro-fibrogéniques [148], [149]. Ils sont

déTECTABLES dans plusieurs tissus tels que les poumons, le foie, dans le sang, la bile ou encore le cerveau [150].

La plupart des espèces d'oxystérols présentées sont générées par des enzymes appartenant à la famille du cytochrome P450 (CYP) tel que le cholestérol 24-hydroxylase et le stérol 27-hydroxylase [151].

La production du 24S-hydroxycholestérol ou « cérébrostérol » comme nommé il y a quelques années en raison de son abondance dans le cerveau murin est catalysée par le CYP46A1. Le 24S-hydroxycholestérol peut facilement traverser la barrière hémato-encéphalique pour pénétrer dans la circulation générale. Le 24S-hydroxycholestérol est un puissant activateur connu du LXR et il sert d'activateur de l'expression des gènes cibles du LXR. Il peut donc agir sur la régulation du métabolisme global du cholestérol.

Le 27-Hydroxycholesterol est catalysé par le CYP27A1. Le CYP27A1 fonctionne avec deux protéines cofacteurs appelées adrénodoxine et adrénodoxine réductase pour hydroxyler une variété de stérols à la position 27. Il est impliqué dans le métabolisme du cholestérol en acides biliaires. Les carences en CYP27A1 entraînent des dysfonctionnements neurologiques progressifs, une cholestase néonatale, des cataractes bilatérales et une diarrhée chronique.

Le CYP7A1 est aussi connu sous le nom de cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase qui n'est exprimée que dans le foie. Cette enzyme catalyse la transformation du cholestérol en acides biliaires. Cette réaction de synthèse des acides biliaires joue un rôle majeur dans la régulation hépatique de l'équilibre global du cholestérol. Le déficit en CYP7A1 se manifeste par une concentration de LDL cholestérol très élevé, des maladies coronariennes et des maladies vasculaires périphériques [152].

Parmi les oxystérols endogènes naturels, le 7 $\alpha$ ,25-dihydroxycholestérol (7 $\alpha$ 25HC) est synthétisé à partir du cholestérol par l'action progressive de deux enzymes : le cholestérol 25-hydroxylase et le CYP7B1. Le CYP7B1 est aussi appelé 25-hydroxycholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase.

Toute anomalie du CYP7B1 peut entraîner une accumulation importante de 27-hydroxycholestérol dans la circulation sanguine, causant ainsi une hypercholestérolémie et une athérosclérose. EBI2 est un récepteur couplé à la protéine G activé par l'oxystérol (7 $\alpha$ 25HC) et régule la réponse immunitaire des cellules T et la migration des cellules B. Rutkowska *et al* montrent que le traitement par LPS des astrocytes de souris modifie les concentrations d'ARNm, d'EBI2 et d'oxystérols, ce qui suggère que la voie de signalisation

EBI2 est sensible aux LPS [153]. Dans les macrophages humains dérivés de monocytes, le LPS favorise une synthèse accrue de Ch25H, du CYP7B1 et une augmentation temporaire de l'expression d'EBI2 [154].

Le 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol est formé à partir du cholestérol par l'enzyme majeure du métabolisme des médicaments, le CYP3A4. Le 4 $\beta$ -hydroxycholestérol est l'un des principaux oxystérols circulants que l'on retrouve à des concentrations élevées chez les patients traités par des médicaments anti-épileptiques comme la carbamazépine, le phénobarbitol et la phénytoïne car ces molécules sont de puissants inducteurs enzymatiques du CYP3A4 [155].

Les 24S-, 25-, 27-Hydroxycholesterol sont des régulateurs importants de la fonction LXR du foie. Dans un modèle de macrophages murins, Spann *et al* montrent qu'une concentration élevée de désmostérol est à l'origine de plusieurs réponses homéostatiques : l'activation des gènes cibles LXR, l'inhibition des gènes cibles SREBP, la reprogrammation sélective du métabolisme des acides gras et la suppression des gènes des réponses inflammatoires [156].

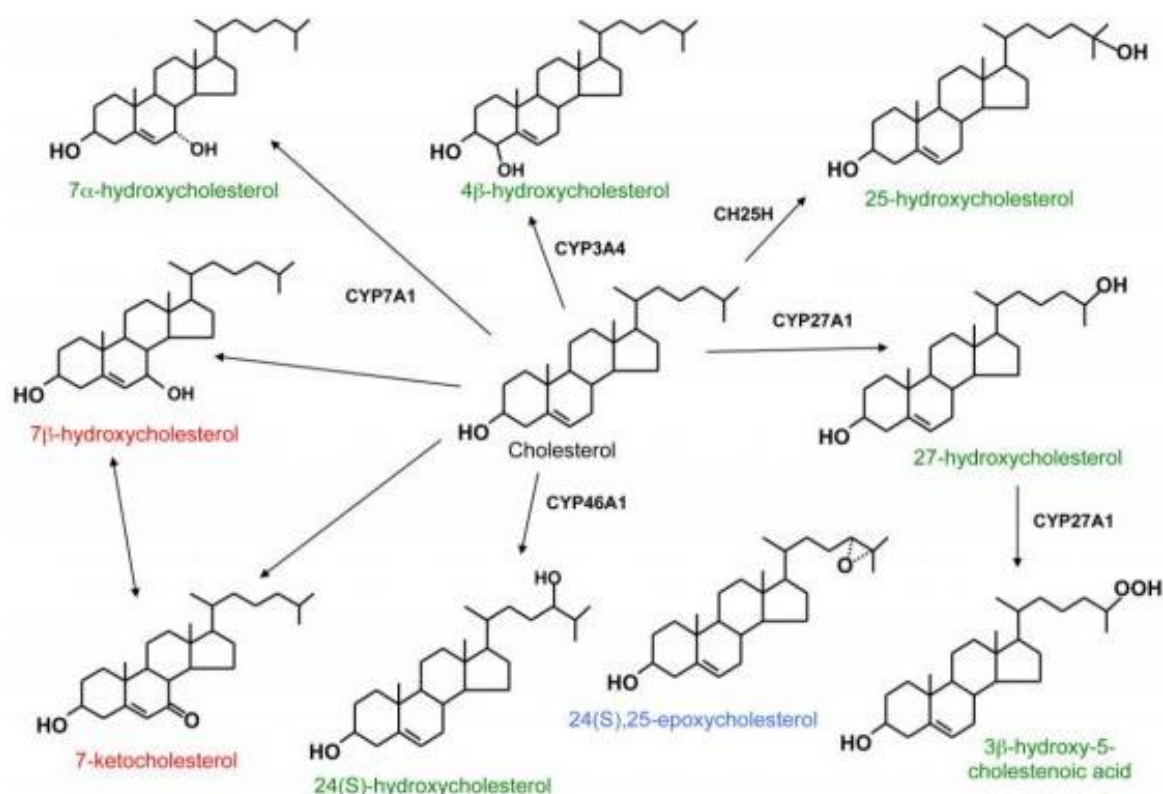


Figure 16 : Structure et origine de certains oxystérols [144]

Les interactions entre le métabolisme et le système immunitaire sont médiées par le 25-hydroxycholesterol [140], [157]. Il amplifie l'activité des cellules immunitaires et augmente la production des médiateurs immunitaires (IL-6, SCF1 et NOS2) [158]. La stimulation des TLR des macrophages induit l'expression du cholestérol 25-hydroxylase et la synthèse du 25-hydroxycholestérol [159].

Chez des souris, le 25-hydroxycholestérol intervient dans la réponse immunitaire plus que dans l'homéostasie du cholestérol puisqu'il n'est pas exprimé dans le foie, organe de synthèse du cholestérol, alors que la réponse inflammatoire est altérée [160].

Des travaux ont démontré que le 25-hydroxycholestérol inhibait la production induite par le LPS d'IL-1 $\beta$  dans les macrophages dérivés de monocytes murins (MDM) [160] et la production de TNF- $\alpha$  dans des macrophages dérivés de monocytes humains [161]. Les travaux montrent aussi que le traitement par le LPS des macrophages entraîne une augmentation de 6 à 7 fois la concentration cellulaire en 25-hydroxycholestérol dans un modèle BMDM [162]. L'injection par intraveineuse de LPS chez huit volontaires sains entraîne une augmentation de la concentration plasmatique de 25-hydroxycholestérol. Le 25-hydroxycholesterol augmente l'expression de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 et joue un rôle dans la réponse inflammatoire. Une inhibition du 25-hydroxycholestérol diminue la production d'IL-1 $\beta$  en passant par les SREBPs [157], [162]. Le 25-hydroxycholestérol possède également des propriétés antivirales [140], [157], [158]. Les études publiées sur l'expression du 25-hydroxycholestérol peuvent paraître contradictoires. Par exemple, le 25-hydroxycholestérol inhibe la production de cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 dans les MDM murins [160] mais stimulerait au contraire la production d'IL-6 par ces mêmes cellules stimulées par le poly(I:C), agoniste des récepteurs TLR3 [158]. Le 25-hydroxycholestérol augmente aussi la production d'IL-6 et de CXCL8 dans les cellules épithéliales bronchiques humaines [163].

Les effets protecteurs semblent subvenir à des concentrations de l'ordre de 100 nM alors que les effets proinflammatoires sont observés à des concentrations supérieures à 10-100  $\mu$ M [160], [163]. De faibles niveaux de l'ordre de 3 à 5 ng/mL de 25-hydroxycholestérol sont présents dans le plasma humain [164]. Peu de travaux ont été faits sur la voie du cholestérol dans le tissu pulmonaire particulièrement sur la caractérisation des altérations cellulaires liés à la polarisation M1/M2 des macrophages pulmonaires humains par approche métabolomique.

Une caractérisation transcriptomique et phénotypique (Travaux laboratoire UPRES EA220) montrent que l'expression des transcrits de 25-hydroxycholesterol était augmentée d'un

facteur 12 dans les macrophages pulmonaires humains après traitement par le LPS comme décrits dans les études portant sur les macrophages murins [160], [162], alors que le traitement par l'IL-4 n'altérait pas l'expression des transcrits. L'expression du CYP46A1 n'est pas affectée par aucun des deux stimuli alors que l'expression du CYP27A1 est diminuée d'un facteur 2 par le LPS. L'expression de CH25H et de CYP7B1 était augmentée en présence de LPS.

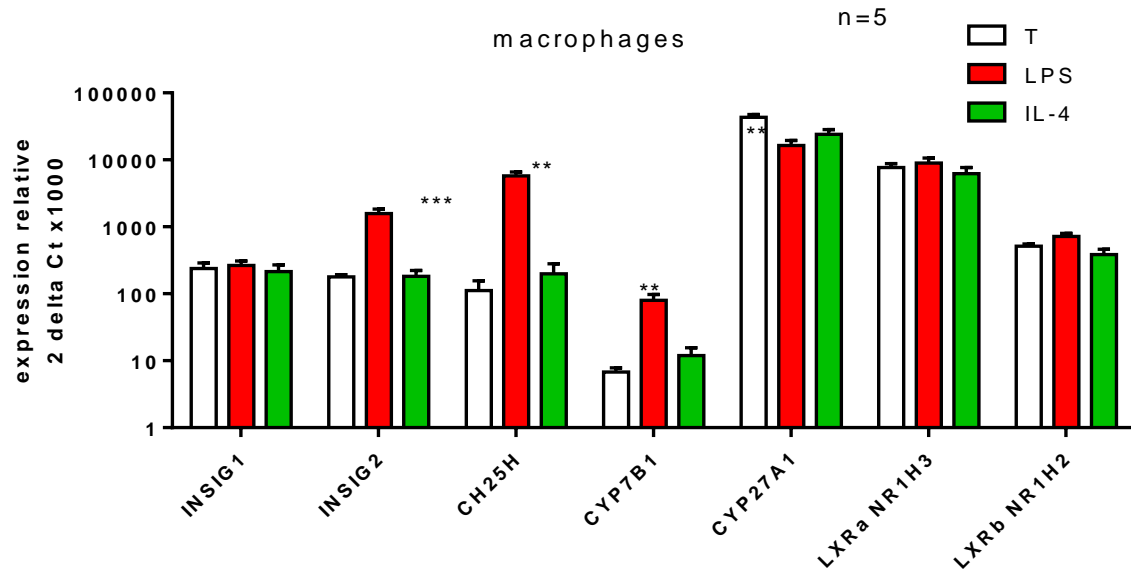


Figure 17 : Étude transcriptomique (RT-qPCR) : effet du LPS et de l'IL4 sur les macrophages pulmonaires humains (UPRES EA220)

Ces informations sont disponibles au niveau des ARNm mais l'étude des substrats et produits de ces différentes enzymes n'a jamais été réalisée dans les macrophages pulmonaires humains.

## VI. Métabolomique et macrophages

La polarisation des macrophages fait l'objet de plusieurs travaux mais les études portent principalement sur des modèles de macrophages dérivés de monocytes (MDM) [22], [89], [114], [115], [165]. En fonction du tissu où ils se trouvent, les macrophages se comportent différemment [166]. Les MDM sont souvent utilisés pour étudier les macrophages mais comme le suggèrent certains travaux, il peut y avoir des différences entre les MDM et les macrophages tissulaires. Victoni *et al* montrent que la production de cytokines induite par la LPS était plus élevée dans les macrophages primaires humains que dans les MDMs. Pour tester les effets anti-inflammatoires des agonistes de  $\beta$ 2-adrénergiques entre les macrophages humains et les MDMs, la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-6 et de trois chimiokines (CCL2, CCL3 et CCL4) ont été évalués. Les résultats montrent que le salmétérol et le formotérol exercent un effet inhibiteur sur la production de TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2, CCL3, et CCL4 dans les MDMs et n'ont pas d'effet sur les macrophages primaires humains. Ils ont aussi évalués les niveaux des transcrits des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques et n'ont pas constaté de différence à ce niveau. Par contre, la quantification des niveaux de protéines de ces récepteurs (évalués par Western blotting) a montré un niveau plus bas dans le modèle de macrophage primaire en comparaison aux MDMs [167]. Kormelink *et al* ont aussi testé l'expression des récepteurs couplés aux protéines G et des canaux ioniques dans les macrophages alvéolaires humains primaires et cinq autres types de cellules couramment utilisés comme substitution *in vitro* des macrophages primaires. Les résultats montrent que les modèles de macrophages utilisés pour mimer le comportement des macrophages alvéolaires primaires humains présentent quelques différences. Ils ont observé des similitudes de profil transcriptomique entre des récepteurs couplés à la protéine G et les canaux ioniques entre les macrophages alvéolaires primaires humains et les MDMs. Néanmoins une grande différence significative dans l'expression de certains gènes (CCR8, CXCR6 et le TRPV4) connus pour jouer un rôle important dans la régulation de la fonction des macrophages alvéolaires a été observée [168]. La concentration du récepteur chimiokine CXCR6 est 1000 fois inférieure dans les MDM que dans les macrophages alvéolaires primaires. Au vu de ces différences, des études sont menées dans le but d'identifier le meilleur modèle alternatif *in vitro* pour les macrophages alvéolaires humains [169]. Ces données confirment l'intérêt d'analyser le métabolisme cellulaire des macrophages pulmonaires humains en plus des études qui ont été effectuées dans les MDM.

Dans les macrophages primaires humains, les études transcriptomiques effectuées pour analyser les gènes codant pour les transcrits de cytokines, du métabolisme lipidique et des

protéines membranaires ont été confirmées pour les molécules protéiques et suggèrent que de nombreuses voies métaboliques sont affectées au cours de la polarisation M1/M2.

L'étude de l'immunométabolisme pour observer le comportement des différents métabolites présents dans les macrophages est un domaine en plein essor mais aucun travail publié n'a caractérisé les altérations cellulaires liées à la polarisation M1/M2 des macrophages pulmonaires par approche métabolomique que ce soit au niveau du métabolome au sens large ou plus particulièrement de la voie des oxystérols.

Les essors récents en spectrométrie de masse ont permis des avancées importantes dans l'étude du métabolisme cellulaire par des approches métabolomiques, qui peuvent être mises à profit pour une exploration plus approfondie du métabolisme cellulaire dans de nombreux contextes.

## CHAPITRE II : LA MÉTABOLOMIQUE

### I. Généralités

La caractérisation complète des systèmes biologiques peut être réalisée à plusieurs niveaux grâce aux sciences « omiques ». La génomique est l'étude de l'ADN, la transcriptomique l'étude des ARN messagers, la protéomique l'étude des protéines exprimées et dernièrement la métabolomique qui est l'étude du métabolome. Elle permet de constituer une signature métabolomique évoluant au cours de la vie, au rythme des mutations, des modifications de l'organisme et des maladies associées. Elle est donc le reflet le plus proche de la fonctionnalité phénotypique d'une cellule ou d'un organisme.

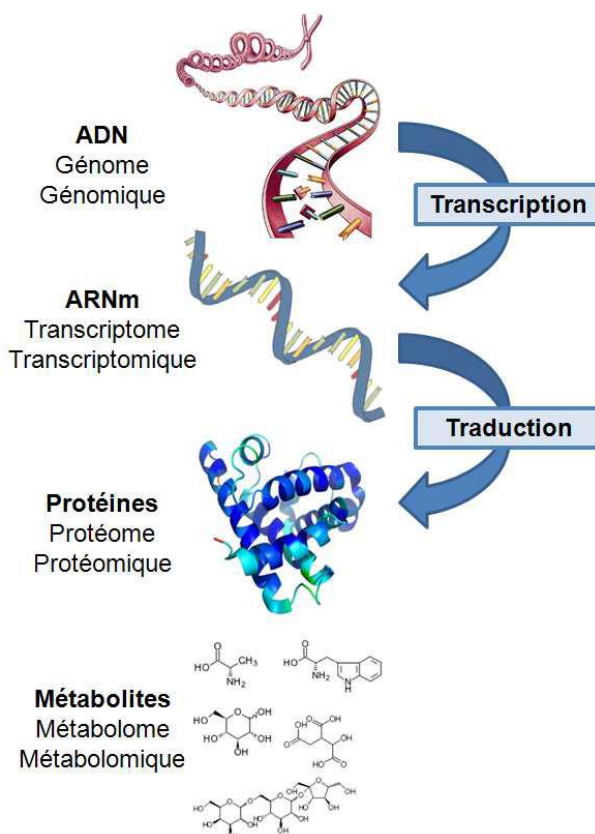


Figure 18 : Les sciences omiques



Le terme métabolome fait référence à tous les métabolites contenus dans l'organisme : cellules ou fluide biologique (urine, salive ou plasma). Il est apparu vers la fin des années 1990 [170]. La métabolomique est une approche analytique qui a pour but de révéler l'ensemble du métabolome constitué de métabolites.

Un métabolite est un composé organique intermédiaire ou issu du métabolisme. C'est le produit de transformation d'une substance organique. Ce sont des molécules qui interviennent dans les réactions par lesquelles les cellules d'un organisme produisent et utilisent de l'énergie. Ce sont des molécules de poids moléculaires inférieurs à 1500 Da. Il existe deux catégories de métabolites : les métabolites endogènes et les métabolites exogènes.

**Les métabolites endogènes** peuvent être classés en deux catégories :

- Les métabolites primaires ou ubiquitaires : ils sont représentés dans le règne animal, végétal et bactérien. Ce sont les métabolites strictement nécessaires pour assurer la survie de la cellule (les acides aminés, les sucres, les lipides, les nucléotides...)
- Les métabolites secondaires ou non ubiquitaires ne sont pas impliqués dans les processus physiologiques fondamentaux de l'organisme mais possèdent des fonctions biologiques importantes et particulières. Dans cette classe on retrouve les plantes, les champignons, les bactéries avec des molécules de types phénols, alcaloïdes, terpènes, des hormones, des neurotransmetteurs.

**Les métabolites exogènes** sont les molécules qui ne sont pas produites directement par l'organisme. Les métabolites secondaires ont essentiellement pour rôle d'accroître la compétitivité de l'organisme qui les biosynthétise. Cependant les métabolites secondaires ont des fonctions biologiques qui peuvent s'avérer essentielles. Cela concerne notamment les xénobiotiques et leurs produits de biotransformation ou de métabolisation.

Le métabolome fournit une lecture fonctionnelle de l'état cellulaire et sert de signature directe de l'activité biochimique. La démarche métabolomique vise l'analyse aussi large que possible du métabolome grâce à des technologies de chimie analytique, de chimométrie et de bio-informatique. Le profil métabolique est très variable en fonction de l'espèce étudiée ou du tissu exploité. Elle est faite à l'aide de différentes méthodes analytiques.

## II. Méthodologie

Sur le plan méthodologique, une analyse métabolomique a pour but d'établir en un minimum d'étapes et de temps une image du profil métabolomique d'un échantillon.

L'analyse du métabolome repose sur l'obtention d'empreintes métaboliques les plus exhaustives possibles (approche globale ou non ciblée), ou de profils métaboliques plus spécifiques (approche ciblée), obtenus à l'aide de différentes méthodes analytiques.

Les métabolites sont divers et variés. C'est un ensemble de molécules appartenant à plusieurs familles chimiques différentes avec des propriétés physico-chimiques très variables. La grande diversité physico-chimique à appréhender simultanément engendre des défauts de sensibilité, d'identification structurale, de résolution auxquels se heurtent aujourd'hui les technologies analytiques.

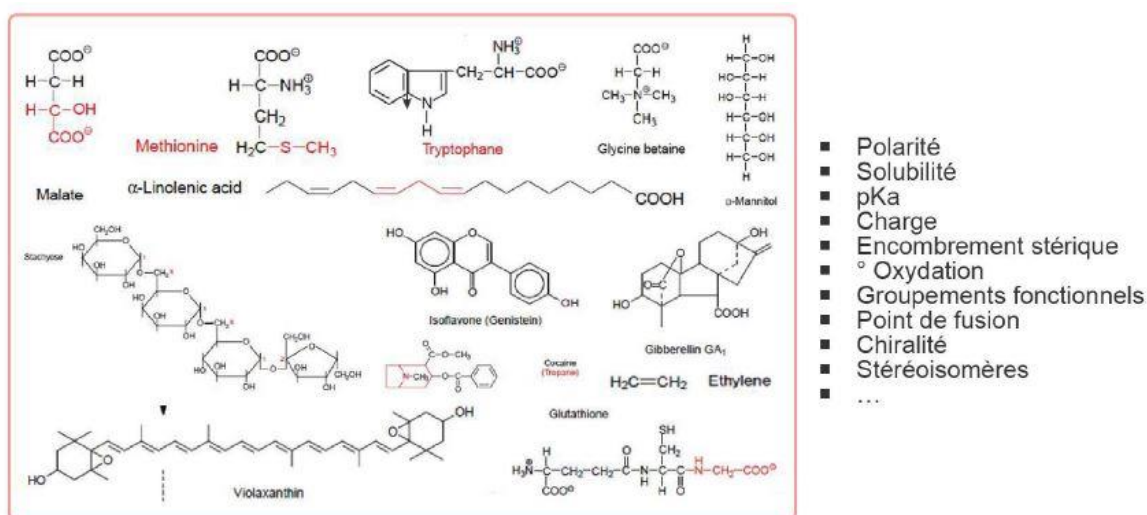


Figure 19 : Diversité physico-chimique des métabolites (Mooc la métabolomique, Alain Bouchereau, Université de Rennes 1)

Il est impossible de réaliser l'analyse du métabolome global d'un échantillon biologique à l'aide d'une seule technique universelle. À ce jour, plusieurs méthodologies sont utilisées pour pallier à cette complexité biologique.

Deux approches complémentaires sont généralement utilisées pour les études en métabolomique. La métabolomique non-ciblée (*metabolomic fingerprinting*) et la métabolomique ciblée (*metabolomic profiling* et *metabolomic target analysis*) sont communément distinguées :

*La métabolomique non ciblée* fait référence à une démarche sans a priori globale du métabolome. Elle a pour but de trouver des biomarqueurs, de comparer des métabolites dont les concentrations sont modifiées en réponse à une pathologie ou à un contexte particulier et à y donner une signification biologique. L'intérêt biologique étant de trouver des signatures métaboliques spécifiques pour détecter des maladies ou des changements d'environnement. Deux termes sont employés pour définir ce type d'approche : métabolomique (pour l'analyse des profils métaboliques exhaustifs) et métabonomique (pour décrire les changements métabolomiques multiples, en réponse à un stress biologique).

*La métabolomique ciblée* a pour but de mesurer spécifiquement un ou plusieurs métabolites ou une famille de métabolites prédéfinis. On parle de profilage métabolique. Elle est utilisée pour les métabolites présents à faible concentration ou qui nécessitent des méthodes d'extractions très spécifiques à cause de leurs propriétés physico-chimiques. Les analyses sont alors quantitatives, précises et sensibles et s'apparentent à des dosages classiques en milieu biologique.

### **III. Approches analytiques en métabolomique**

Les deux principaux outils analytiques fournissant l'information structurale des métabolites sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS et LC-MS).

La RMN permet de déterminer la structure d'une molécule mais c'est aussi également une méthode d'analyse quantitative de mélanges complexes tels que ceux rencontrés en métabolomique. L'avantage de cet outil analytique est qu'elle nécessite une étape de préparation peu contraignante et permet de travailler sur des échantillons natifs. C'est une méthode très répétable mais peu sensible. Dans plusieurs articles, la RMN est utilisée pour l'acquisition des données en métabolomique mais en raison de sa sensibilité basse, un maximum de 60 métabolites est détecté dans les échantillons. [171], [172].

La spectrométrie de masse (MS), contrairement à la RMN, est une méthode très sensible et spécifique qui permet de détecter une large gamme de métabolite présent dans différentes matrices. Elle permet de caractériser des molécules aux propriétés physico-chimiques très variées en donnant lorsque nécessaire une information de nature quantitative.

Le principe de la spectrométrie de masse réside dans la séparation de molécules en fonction de leur ratio masse/charge ( $m/z$ ). Les dernières décennies ont été marquées par l'essor de la spectrométrie de masse dans la recherche biologique et clinique.

Pour être détectées en spectrométrie de masse, les molécules doivent être ionisées. Les analytes peuvent être introduits dans le système par infusion directe ou en utilisant une technique séparative. L'avantage de ce couplage est de diminuer le nombre de composés coélus susceptibles d'interférer dans la source d'ionisation. Les techniques séparatives comme la chromatographie liquide (LC) et la chromatographie gazeuse (GC) permettent ainsi de diminuer le nombre de molécules détectées simultanément, d'analyser les isomères et d'améliorer ainsi la détection par le spectromètre de masse.

#### **IV. Acquisition et traitement des données en métabolomique**

La qualité de l'analyse métabolomique dépend du design expérimental [173]. La démarche opérationnelle en métabolomique repose sur une succession d'étapes désignée par le terme anglais « workflow » qui vont impacter sur la qualité et la quantité de données obtenues. Ce dernier désigne l'ensemble des étapes à effectuer afin de répondre à une question biologique [174], [175].

Il est composé de la collecte des échantillons, de l'acquisition des données, des analyses statistiques et de l'interprétation biologique.

La première étape est le questionnement biologique. Il s'agit de définir le type d'analyse que l'on souhaite faire et dans quel but. Il peut y avoir plusieurs facteurs confondants tels que l'âge [176], le genre [177], les facteurs environnementaux tels que l'alimentation ou le mode de vie [178] qui masquent le phénomène biologique que l'on souhaite étudier. Les facteurs peuvent être d'origine biologique ou analytique et leur impact doit être contrôlé autant que possible. Certains de ces facteurs peuvent être contrôlés et répartis de manière homogène dans différents groupes si besoin.

L'objectif principal du questionnement biologique est la recherche de nouveaux biomarqueurs [179] pour comprendre les variations biologiques spécifiques des variations biologiques non explicites [174]. À la suite de ce questionnement, un design expérimental est réfléchi et mis en place.

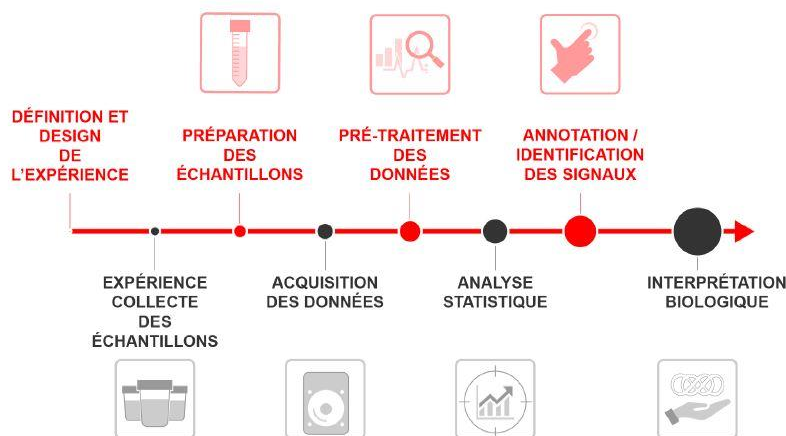


Figure 20 : Design expérimental d'une analyse en Métabolomique

## 1. Collecte et préparation des échantillons

La collecte des échantillons est cruciale dans l'analyse métabolomique. Elle doit suivre une procédure unique et reproductible qui a été définie lors de la conception de l'étude. Elle influe directement sur l'homogénéité des résultats [180], [181].

Le choix des échantillons et le protocole de préparation doivent se faire de manière à minimiser les variations indésirables et à éviter l'introduction de contaminants externes car cette partie du processus a des conséquences sur le profil métabolomique généré. Il est donc important de faire des témoins, des contrôles qualités, des blancs (du milieu de culture pour les cas de cultures cellulaires). Selon l'application les échantillons peuvent être de structure très variée : tissus, matériels végétaux, biofluides, matrices microbiennes....

La préparation d'échantillons dépend de la matrice utilisée. Pour l'analyse non ciblée, la préparation d'échantillon ne doit pas être sélective, elle doit être minimale pour analyser la globalité de l'échantillon et rapide pour éviter la dégradation des métabolites [182]–[184].

- **Metabolome extracellulaire**

Plusieurs méthodes d'extraction avec utilisation de différents solvants d'extraction apparaissent dans la littérature. La méthode de Bligh and Dyer a longtemps été considérée comme la méthode standard pour l'extraction des métabolites lipidiques. Il s'agit d'une

séparation biphasique liquide en utilisant un mélange de solvants méthanol (MeOH)/chloroforme(CHCl<sub>3</sub>)/eau(H<sub>2</sub>O) (1/2/1). Dans ce type d'extraction, les composés polaires se retrouvent dans la phase supérieure composée de MeOH/H<sub>2</sub>O et les composés apolaires dans la partie inférieure contenant le CHCl<sub>3</sub>. Les composés tels que l'ADN ou ARN se retrouvent en suspension à l'interface des deux phases [185]. Les fractions sont ensuite analysées en mode HILIC et RP. La séparation des métabolites en partie polaire et non polaire dans cette méthode n'est jamais exacte et il est possible de passer à côté d'un grand nombre de métabolites.

Fei *et al* ont comparé deux méthodes d'extraction avec des solvants d'extraction contenant du MeOH/ethanol(EtOH)/H<sub>2</sub>O (2/2/1) et du MeOH/EtOH (1/1). Dans cette méthode, les protéines et autres macromolécules sont précipitées. Ils considèrent alors que la fraction MeOH/EtOH contient tous les métabolites lipidiques polaires et non polaires. Le mélange est ensuite analysé en mode HILIC. La comparaison des 3 solvants d'extraction montre que le mélange MeOH/EtOH/H<sub>2</sub>O semble permettre un meilleur recouvrement des fractions polaire et non polaire avec une manipulation minimale de l'échantillon [186].

Lin *et al* ont utilisé du MeOH comme solvant d'extraction pour analyser du serum de patients souffrants de cancer du rein et les métabolites identifiés sont essentiellement des phosphatidylcholines, des sphingomyélines, des thromboxanes... [187]. Xiaoming Cai & Ruibin Li ont utilisés trois solvants d'extraction : MeOH, MeOH/acétonitrile(ACN)/acétone (1/1/1), ou un solvant biophasique CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2/1) pour extraire des plasmas de patients fumeurs et non fumeurs. Ils ont montré que le solvant MeOH/ACN/acétone est très efficace pour l'extraction des métabolites et lipides polaires du plasma humain [188]. Cai *et al* ont utilisés du MeOH pour analyser des échantillons de plasma humain de volontaires féminins et masculins en LC-MS en utilisant différents types de colonnes chromatographiques. Ils ont montré qu'un solvant constitué de 100% de MeOH permettait d'extraire les métabolites de faible polarité [189]. Ces différentes études montrent que chaque solvant d'extraction privilégie une famille de molécules au détriment d'autres.

- Metabolome intracellulaire

Les procédures d'extraction de métabolites en milieu cellulaire décrites sont souvent basées sur l'utilisation de solvants organiques, avec ou sans eau ou autres solvants chlorés à différents températures et pH [190]. Des comparaisons entre différents solvants contenant du

chloroforme ou du dichlorométhane ont montré une grande efficacité pour extraire les métabolites lipophiles, les lipides avec une reproductibilité optimale [190], [191].

Pour détecter l'endo-métabolome de manière fiable et complète, les métabolites doivent être efficacement extraits. La procédure d'extraction devrait éviter les interférences potentielles, assurer une perte minimale de métabolites et être compatible avec les procédures analytiques ultérieures.

Bi *et al* ont testés 4 solvants pour extraire des métabolites intracellulaires à partir des cellules adhérentes (cellules pancréatiques). L'ACN pur, le MeOH, un mélange MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O et MeOH/CHCl<sub>3</sub>/ACN ont été testés et les échantillons analysés en LC-MS avec des colonnes HILIC et RP. Ils ont identifié le mélange MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O comme étant le solvant d'extraction optimal pour récupérer le maximum de métabolites intracellulaires avec la meilleure reproductibilité. [192]

Cañaveras *et al* ont aussi testé l'efficacité de cinq solvants d'extraction dans le but d'analyser les métabolites présents dans des cellules de mammifères. H<sub>2</sub>O avec 1 mM Hepes et 1 mM EDTA à pH 7.2 (S1) ; du MeOH (S2) ; un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH/CHCl<sub>3</sub> (10/27/3) (S3) ; un mélange H<sub>2</sub>O/MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1/1/1) (S4) et un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O + MeOH/CHCl<sub>3</sub> (S5) ont été testés. Les métabolites ont été analysés en LC-MS avec deux colonnes RP et une HILIC en mode positif et négatif. Il est apparu que les mélanges S1, S2, S3, et la phase aqueuse de S5 permettent d'extraire de manière efficace les molécules polaires et lipidiques. La phase organique de S4 et la phase organique de S5 permettaient uniquement d'extraire les lipides. La phase aqueuse de S4 n'extrait que les métabolites polaires [193].

Pour l'analyse en GC-MS, Duportet *et al* ont testé plusieurs solvants d'extraction pour extraire les métabolites intracellulaires : de l'éthanol porté à ébullition à pH 7,5 ; un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1) froid, du MeOH froid à -30°C. Les résultats montrent que chaque solvant d'extraction génère un profil métabolomique différent. La plupart des métabolites moins polaires semblent mieux sortir avec le méthanol pur et le méthanol pur couplé à des méthodes de sonication (acide oléique, acide stéarique, acide myristique, acide caprinique). L'éthanol en ébullition extrait des composés très polaires (acide aminobutyrique, acide aspartique, glycine, acide lactique) [184].

En résumé pour les échantillons solides ou complexes, différentes méthodes d'extraction devront être mise en place ce qui aura un impact sur le métabolome résultant. Les principales stratégies d'extraction utilisées sont : l'extraction sur phase solide, l'extraction liquide-

liquide, la précipitation par l'ajout de solvants organiques miscibles à l'eau et les méthodes de centrifugation comme la dialyse ou l'ultracentrifugation. La très grande diversité de métabolites potentiellement présents dans un échantillon biologique en terme de propriétés physico-chimiques (hydrophilie/hydrophobie, volatilité, réactivité / stabilité chimique) et de concentration rend l'analyse complexe. Il n'y a pas de méthode standard de collecte ou de préparation qui permette en une seule analyse de couvrir tout le métabolome. Tout type de préparation et d'acquisition entraîne des pertes d'analytes totales ou partielles [194].

Les résultats des études [182]–[186], [190], [193] montrent que différentes méthodes d'extraction à base de solvants peuvent donner des profils métaboliques significativement différents, ce qui a un impact considérable sur l'interprétation biologique des données métabolomiques.



## **2. L'acquisition par spectrométrie de masse**

Compte tenu de la variabilité des métabolites déjà évoquée, il n'existe pas de technique d'acquisition unique permettant de voir l'ensemble des métabolites en une analyse. Souvent la GC-MS qui analyse les petites molécules volatiles ou semi volatiles est combinée à la LC-MS pour augmenter la détection et ainsi couvrir une large gamme de spectres. En LC-ESI-MS il existe plusieurs modes d'acquisition avec plusieurs paramètres de masse susceptibles d'être optimisés [195], [196].

### **2.1. Séparation Chromatographique**

C'est une technique qui permet de séparer les différents constituants d'un mélange. Le principe repose sur les affinités des composés entre deux phases non miscible dont l'une dite stationnaire est emprisonnée dans une colonne, ou fixée sur un support, et l'autre dite mobile qui se déplace au contact de la première.

**La chromatographie gazeuse** (GC) est une méthode de séparation des composés volatils et semi volatils basée sur l'interaction entre ceux-ci et la phase stationnaire. En métabolomique la GC est utilisée pour les petites molécules de poids moléculaire inférieur à 650 Da [197] tels que les petits acides, les acides gras, les stérols, les alcools, les acides hydroxyles, les acides aminés et les composés endogènes. Elle est couramment utilisée pour séparer les isomères.

La sensibilité et la spécificité de détection des métabolites constitue un grand atout pour l'analyse en GC-MS [198]. L'impact électronique conduit à des spectres de fragmentation complexes et riches qui peuvent être utilisés pour augmenter la spécificité dans l'adaptation spectrale de masse, surtout si ces spectres de masse sont enregistrés dans de grandes bibliothèques [199]. Contrairement aux techniques d'ionisation douce telles que ESI, EI est un processus d'ionisation hautement reproductible sur plusieurs plates-formes [200].

Il existe plusieurs types de colonnes utilisés en chromatographie en phase gazeuse tels que les colonnes remplies en verre, les colonnes remplies en acier inox et les colonnes capillaires en silices fondues. Le gaz a pour fonction de pousser les composés vers le détecteur. Différents types de gaz ayant une faible viscosité sont utilisés (l'azote, l'hélium et l'hydrogène). Les analytes, à l'état gazeux, sont ainsi entraînés par le gaz vecteur et leur séparation se fait en fonction du débit appliqué à ce gaz, de la température appliquée à la colonne et de son pouvoir de rétention. Pour rendre volatil l'échantillon, des réactions de dérivation sont effectuées.

La dérivation chimique des molécules est nécessaire pour réduire la polarité des groupes fonctionnels et faciliter la séparation en GC. Elle est utile aux molécules ayant une faible volatilité et/ou stabilité thermique. La dérivation peut également améliorer la forme des pics chromatographiques et la résolution des composés structurellement proches [201], [202].

Il existe plusieurs manières de faire mais les réactions de silylation (triméthylsilylation ou tert-butyldiméthylsilylation) sont les plus utilisées [201]. La réaction de silylation consiste en un remplacement des atomes d'hydrogène H dans les groupes hydroxyles OH (alcools, phénols, acides carboxyliques, oximes, sulfo-acides, acides boriques, acides phosphoreux, énols), NH (amines, amides, imines) et SH (thiols, acides thiolcarboxyliques) par un groupe triméthylsilyle TMS (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

La réactivité des différents groupes fonctionnels vis-à-vis de la triméthylsilylation varie dans l'ordre suivant : alcool (primaire > secondaire > tertiaire) > phénols > acides carboxyliques > amines terminales > amides acides > amines secondaires [203]. Le N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) et le N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) sont les agents de dérivation les plus utilisés. Les réactions de silylation sont souvent utilisées en parallèles des réactions de méthyoxgénation avec le méthoxime (MeOx) [197], [204]. La méthyoxgénation de la pyridine n'affecte que les métabolites qui contiennent des groupes cétoniques, tout groupe cétone (-CO) est transformé en groupe MEOX (-CN-O-CH<sub>3</sub>) plus stable et non polaire [204]. Cette réaction est suivie de la silylation pour obtenir un dérivé plus volatil, non polaire et stable.

Les procédures de silylation débutent par une étape préliminaire au cours de laquelle l'échantillon à analyser est séché car l'eau détruit les réactifs de silylation. Le résidu anhydre est ensuite traité avec un petit volume d'un mélange de réactif de silylation fermé hermétiquement et soumis à un traitement thermique avant d'être injecté en GC-MS.

**La chromatographie liquide** (LC) est une technique séparative analytique et/ou préparative. Les composés sont séparés en fonction de leur affinité avec deux phases, l'une stationnaire, et l'autre mobile. Il existe une grande variété de phases stationnaires. Les séparations se font essentiellement en mode phase inverse ou en phase normale (HILIC) et sous haute pression allant de 200 à 900 bars (HPLC, UPLC).

Avec la phase inverse, la phase stationnaire est constituée de silice (ou d'un polymère spécifique) greffée à l'aide de chaînes alkyles de différentes tailles (C<sub>4</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>). Il se produit un phénomène d'adsorption par un mécanisme de partition entre la phase mobile et la phase

stationnaire. Elle est caractérisée par plusieurs facteurs tels que le type de ligand, la composition de la phase mobile, le diamètre des pores, la taille des particules, la dimension de la colonne, la température de la colonne et les additifs pour améliorer la rétention des composés. En chromatographie en phase inverse, la rétention augmente avec l'hydrophobie des composés. Les colonnes sont de longueur (L) et de diamètre interne (D) variables (généralement,  $L < 30$  cm et  $D < 5$  mm) pour une taille de particules de 3-5  $\mu\text{m}$  en HPLC et inférieur à 2  $\mu\text{m}$  en UPLC.

En phase inverse les  $C_{18}$  sont connues pour avoir une bonne résolution des pics, elles sont utilisées pour les composés apolaires lipophiles. Elles présentent une bonne sélectivité et symétrie des pics.

Dans le cas de la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC), la phase stationnaire peut être constituée d'une structure sulfobetaine zwitterionique. Elle est basée sur l'utilisation d'une phase stationnaire polaire en silice vierge ou silice/polymère greffée amide, amino, diol..., avec une phase mobile de type hydro-organique. Cette technique chromatographique utilise une phase stationnaire polaire et une phase mobile hydro-organique pour la séparation de petites molécules très polaires et sur une large gamme de pH (acides aminés, peptides, carbohydrates, acides nucléiques).

Plusieurs techniques de métabolomique utilisant la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse ont été publiées ces dernières années. Les propriétés physico-chimiques des métabolites varient considérablement, ce qui rend leur extraction, leur séparation et leur détection simultanées très difficiles.

Dans certaines publications, plusieurs types de colonnes avec différentes propriétés physico-chimiques séparant différemment les molécules sont utilisées. Tang *et al* montrent que l'analyse par la chromatographie d'interaction hydrophile couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HILIC-MS/MS) permet de couvrir les molécules hautement polaires et qu'elle est largement complémentaire de l'analyse métabolomique à base de colonne à phase inverse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (RP-MS/MS) [205].

La majorité des études métabolomiques utilisent la phase inverse mais bien qu'étant la plus utilisée et la mieux documentée, elle n'est pas vraiment adaptée à l'analyse des espèces fortement polaires. Elle permet une assez bonne séparation des composés apolaires et faiblement polaires. Cependant, la principale limitation est la mauvaise rétention des molécules hautement hydrophiles, ioniques et polaires [206], [207].

L'HILIC gagne en popularité en raison de sa grande compatibilité avec la MS et sa capacité à analyser les molécules polaires. Elle est utilisée pour analyser les molécules comme les lipides polaires ou les acides tricarboxyliques [205]. L'HILIC est utilisée pour analyser et séparer les molécules soufrées polaires (cystéine, homocystéine, méthionine, S-adénosylhomocystéine et les acides hydroxyalkyl mercapturiques) [208], [209]. Elle est aussi utilisée pour détecter et analyser des acides aminés comme l'ornithine [210], la proline, la trans-L-4-hydroxyproline, la nitrotyrosine, la L-tyrosine (Tyr) [211]. Les lipides qui sont des molécules hydrophobes sont aussi analysés avec l'HILIC : les phospholipides [212], les sphingolipides, les sphingosylphosphorylcholines, les hexosylcéramides, les lactosylcéramides, les céramide-1-phosphates, les dihydrocéramide-1-phosphates [213]. Les composés polaires, comme les sucres phosphorylés, les nucléotides, les acides organiques et les acides aminés sont aussi souvent analysés en HILIC-ESI-MS/MS [214].

Boudah *et al* ont étudié la pertinence de la chromatographie liquide en utilisant trois systèmes chromatographiques différents : RP, HILIC et une phase stationnaire pentafluorophénylpropyle (PFPP) couplée à la MS en mode positif (permet la détection des molécules chargées positivement) et négatif (permet la détection des molécules chargées négativement). Ils ont montré que moins de 12% de ces métabolites étaient partagées entre les trois systèmes chromatographiques et que la colonne HILIC assurait la plus grande couverture du métabolome en mode d'ionisation négative, tandis que la colonne PFPP était la plus efficace en mode d'ionisation positive [215]. Contrepois *et al* montrent que dans le plasma humain, l'utilisation d'une colonne HILIC en plus de la RP augmente d'environ 108% la couverture du métabolome [216].

Certaines études sur des échantillons humains ou d'animaux montrent que l'HILIC améliore la séparation des isomères et semble donner une meilleure résolution des pics chromatographiques. Ceci montre la nécessité de combiner plusieurs types de colonnes chromatographique (HILIC et RP) [205].

Cependant la combinaison des méthodes HILIC et RP génèrent deux lots de données qui sont souvent difficiles à fusionner.

Voici un tableau non exhaustif des méthodes combinant plusieurs types de colonnes chromatographiques pour l'analyse du métabolome humain sur des matrices comme le plasma ou les cultures cellulaires.

Tableau 2. Liste de publications utilisant plusieurs types de colonne.

Matrice	Phase stationnaire	Phase mobile	LC-MS	Références
Serum humain	- Atlantis HILIC (150 × 2.1 mm, 3 µm); Waters. - Acclaim C <sub>18</sub> (150 × 2.1 mm, 3 µm); Dionex.	<b>HILIC.</b> A: 10 mM acetate ammonium + 0.1% AF; B: ACN + 0.1% AF <b>RP.</b> A: H <sub>2</sub> O + 0.1% AF; B: ACN + 0.1% AF	LC-TOF	Lin et al. ; 2011 [187]
Plasma humain	- Atlantis HILIC (150 × 2.1 mm, 3 µm) ; Waters - C <sub>5</sub> (100 × 2.1 mm, 5 µm) Phénoménex - C <sub>18</sub> (100 × 2.1, 3.5 µm) ; Agilent	<b>HILIC.</b> A: ACN ; B: 50 mM formate d'ammonium <b>RP.</b> A : H <sub>2</sub> O/ACN (98/2, v/v) ; B : ACN/ H <sub>2</sub> O (35/65, v/v) ; C : Isopropanol/ACN/ H <sub>2</sub> O (60/35/5, v/v/v)	LC-LTQ-FTMS	Xiaoming Cai & Ruibin Li : 2016 [188]
Plasma humain	- Acquity BEH HILIC (100 × 2.1 mm, 1.7 µm); Waters. - Acquity BEH C <sub>18</sub> (100 × 2.1 mm, 1.7 µm); Waters.	<b>HILIC.</b> A: 10 mM acetate ammonium + 0.1% AF; B: 95 % ACN + 10 mM acetate ammonium. <b>RP.</b> A: H <sub>2</sub> O + 0.1% AF; B: ACN	UPLC-Q/TOF	Cai et al. ; 2009[189]
Bactéries, cellules humaines cancéreuses	- Luna Aminopropyl (150 × 1.0 mm, 3.0 µm); Phenomenex. - XBridge C <sub>18</sub> (150 × 1.0 mm, 3.5 µm); Water	<b>HILIC.</b> A: 10 mM acetate ammonium + 95% H <sub>2</sub> O ; B: 95% ACN <b>RP.</b> A: H <sub>2</sub> O + 0.1% AF; B: ACN B : ACN + 0.1% AF (positive mode). A: 0.5 mM ammonium fluoride; B: ACN (negative mode)	UPLC-Q/TOF	Ivanisevic et al., 2013 [217]
Culture cellulaire pancreatic	- ACQUITY® BEH Amide HILIC (50 × 2.1 mm, 1.7 µm) Waters - BEH C <sub>18</sub> (50 × 2.1, 1.7 µm) Waters	<b>HILIC.</b> A: 10 mM ammonium acetate + 10 % ACN ; B: 90 % ACN <b>RP.</b> A: H <sub>2</sub> O + 0.1% ; B: ACN + 0.1%	UPLC-QTOF-MS	Bi et al, 2014 [192]
Serum humain	- ZICpHILIC (150 × 2.1 mm, 5 µm) Merk - HS F5 PFPP (150 × 2.1 mm, 5 µm) Sigma - C <sub>18</sub> hypersil GOLD (150 × 2.1 mm, 1.9 µm) Waters	<b>HILIC.</b> A: 10 mM ammonium carbonate + ammonium hydroxyde pH = 10.5 ; ACN <b>RP et PFPP :</b> A: H <sub>2</sub> O ; B: ACN	UPLC-Q-Exactive	Boudah et al ; 2014 [215]

Contrepois *et al* ont évalué la complémentarité des méthodes HILIC et RP à une masse exacte de ( $\pm 10$  ppm) en faisant de la métabolomique sur du plasma et des urines. Dans cette étude l'utilisation de HILIC en combinaison avec RPLC a augmenté la couverture du métabolome de l'urine de  $\sim 44\%$  par rapport à la RP seule. Pour le plasma, l'HILIC a permis la détection de 2 100 (+68 %) et 2 826 (+148 %) nouveaux pics métaboliques dans les modes ESI positif et négatif respectivement en comparaison à la RP. L'HILIC a considérablement augmenté la couverture du métabolome du plasma de  $\sim 108\%$  par rapport à la RP. Ils ont aussi montré que très peu de métabolites ont été trouvés aux mêmes temps dans les modes ESI positif et négatif, ce qui indique qu'ils détectent des métabolites distincts [216].

Dans le cas d'échantillons de cultures cellulaires, la caractérisation complète du métabolome cellulaire est difficile car la cartographie du métabolome humain est compliquée. Les cellules cultivées sont des modèles utiles dans la recherche biomédicale qui caractérisent les réponses métaboliques en réponse à divers stimuli et explorent les mécanismes sous-jacents. Cependant, les conditions de croissance des cellules, les variations inter plateformes de méthodes utilisées peuvent influencer sur les métabolites secrétés. Il existe un ensemble de publications sur des cellules humaines qui permettent d'analyser plusieurs voies métaboliques [192], [217]–[220].

Ivanisec *et al* ont travaillé sur des cellules humaines cancéreuses. Ils ont analysé le métabolome en HILIC-MS et en RP-MS dans le but d'optimiser une méthode leur permettant de voir un grand nombre de métabolites [217]. Bi *et al* ont analysé les métabolites présents dans la lignée cellulaire Panc-1 du cancer du pancréas humain. Ils ont testés plusieurs méthodes d'extraction différentes pour voir celle optimale pour ce type de cellule. Les échantillons ont été analysés en HILIC-MS et en RP-MS. Ils montrent que le mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MEOH}/\text{H}_2\text{O}$  leur offrait un meilleur rendement et une meilleure reproductibilité pour les lignées cellulaires Panc-1 et pour éventuellement d'autres types de cellules cancéreuses ayant les mêmes propriétés physico-chimiques [192]. Dans une étude visant à définir les facteurs régulateurs qui peuvent être utilisés pour maximiser la production de protéines recombinantes commercialement valables à partir de cellules de mammifères en culture, des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) recombinantes ont été analysées. Les méthodes de récolte des tissus ont été optimisées et les échantillons ont été analysés en GC-MS [220]. Adamson *et al* ont utilisé la métabolomique pour évaluer les réponses des macrophages murins exposés aux nanoplaquettes de graphène. Ils ont utilisé une colonne RP avec des particularités de rétention de composés polaires. Dans cette étude, un ensemble de métabolites

appartenant à la voie de l'acide arachidonique (5S-HETE-d8, 20-hydroxy-LTE4), du glutathion (acide pyroglutamique, NADPH) et des purines (guanine, acide urique) ont été identifiés [221]. Pour étudier l'immunotoxicité du bisphénol S sur des macrophages murins, Zhao *et al* ont utilisés deux types de colonne chromatographique RP avec des pouvoirs de rétention différents pour avoir une couverture large du métabolome cellulaire. Les résultats montrent que l'exposition au bisphénol S entraîne la baisse des sphingomyélines, une augmentation d'autres métabolites tels que les céramides, des variations sur la production des cytokines et sur la polarisation des macrophages en général. Ils ont aussi déterminé que la variation du métabolisme lipidique dans les échantillons traités au bisphénol S était très semblable au métabolisme lipidique des macrophages polarisés M1 [222]. Pour tester l'effet des stimuli immunitaires (LPS, IFN $\gamma$ ) sur le métabolisme cellulaire des BMDM de souris, des études métabolomiques ont été effectuées. Pour cette étude du métabolisme cellulaire, une colonne ZIC-pHILIC a été utilisée et des métabolites appartenant au cycle de Krebs, à la voie de la glycolyse et au métabolisme des purines ont été identifiées lors de cette étude métabolomique [115]. Des études métabolomiques de MDM humains infectés par VIH-1 et le VIH-2 ont été effectués par Hollenbaugh *et al* en utilisant une colonne de type RP. Les métabolites tels que le quinolinate ou le ribose-5-phosphate étaient différentiellement exprimés entre les deux souches. Des profils métaboliques très similaires pour la glycolyse et le cycle de Krebs ont été retrouvés entre les macrophages infectés par le VIH-1 et le VIH-2 [223].

Dans la majorité des études métabolomiques pourtant sur les macrophages, la séparation chromatographique des métabolites est réalisée avec un seul type de colonne. Connaissant la grande diversité structurale des métabolites, il serait intéressant d'en utiliser plusieurs avec des pouvoirs de rétentions différentes. La bibliographie montre une absence de travaux effectués sur des macrophages pulmonaires humains en métabolomique. Il est donc intéressant d'optimiser plusieurs paramètres analytiques et de les adapter à notre type cellulaire.

## **2.2. La détection par spectrométrie de masse**

Il existe différents modes de détection du signal lors de l'analyse métabolomique et nous allons nous intéresser à la spectrométrie de masse.

Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation où se réalise l'ionisation, d'un analyseur qui trie les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ , d'un détecteur qui comptabilise l'abondance des ions et d'un logiciel qui permet la visualisation et le traitement du signal. Les données ainsi générées sont en trois dimensions : rapport  $m/z$ , intensité du pic et temps de rétention lorsque ce dernier est précédé d'une LC ou GC.

Les performances analytiques d'un spectromètre de masse dépendent du type d'analyseur utilisé, de la vitesse de balayage qui correspond au temps pour établir un spectre, de la résolution qui est la capacité de distinction de deux pics voisins, de la précision ou de la capacité du système à donner un  $m/z$  proche de la valeur théorique.

- **Sources d'ions**

### **Couplage à la chromatographie liquide**

La LC-MS offre ainsi une multitude de combinaisons (phases stationnaires / source d'ions / analyseurs) qui en fonction du type de molécule que l'on veut étudier, permet d'accroître la détection des métabolites.

Il existe plusieurs méthodes d'ionisation [224]. Dans la source d'ionisation, des ions sont formés à partir de l'échantillon vaporisé.

L'électronébulisation (ou électrospray, ESI) est une source d'ionisation douce à pression atmosphérique. C'est la méthode la plus utilisée en couplage LC-MS. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation en mode positif (ESI+) et en mode négatif (ESI-). En mode positif, il est possible de former des ions multichargés de types  $[M+nH]^{n+}$  où les charges sont apportées le plus souvent par un ou plusieurs protons. Cette étape d'ionisation est nécessaire pour la détection par MS. Elle permet de transformer le composé élué dans la phase liquide en ion gazeux.

En ESI, une solution est pulvérisée à travers un capillaire chauffé. Un courant de gaz sec (diazote,  $N_2$ ) est ensuite dirigé dans le spray qui est soumis à une différence de potentiel de quelques kV. Des gouttelettes chargées sont alors produites, celles-ci se réduisent au fur et à mesure de l'évaporation du solvant. L'excès de charges électriques dans chaque gouttelette,



combiné à l'évaporation progressive des solvants, conduit à la formation d'un cône dynamique à l'extrémité du capillaire appelé « cône de Taylor ». Lorsque la charge de la solution qui forme le cône de Taylor s'approche de la limite de Rayleigh, les répulsions coulombiennes excèdent les forces de cohésion des gouttelettes. Ce phénomène induit une cascade d'explosions coulombiennes au cours de laquelle des microgouttelettes sont formées, permettant ainsi la désorption des molécules.

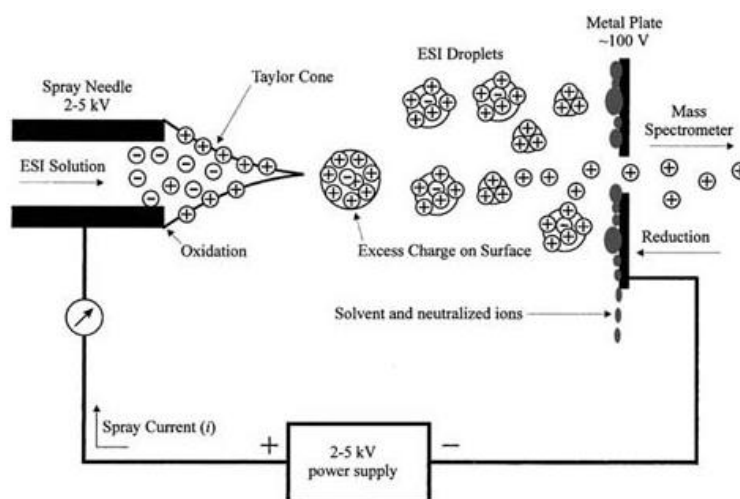


Figure 21 : Schéma d'une ionisation par électrospray

Deux autres sources d'ions comme l'APCI (atmospheric pressure chemical ionization) ou l'APPI (Atmospheric pressure photoionization) qui peuvent être utilisées en couplage LC-MS. L'ESI et l'APCI sont les plus utilisées en couplage LC-MS. L'APCI fait appel à des réactions ion-molécules en phase gazeuse à pression atmosphérique. Comme pour ESI, l'ionisation engendre également une protonation ou une déprotonation des molécules [225]. C'est une méthode d'ionisation assez douce adaptée aux petites molécules peu polaires. L'ionisation est très efficace car elle se passe à pression atmosphérique ou la fréquence de collision peut être élevée. Les solutions sont nébulisées à l'aide d'un courant de diazote. La désolvatation est favorisée par chauffage [226]. C'est une méthode complémentaire de l'ESI qui permet l'ionisation des composés moyennement polaires. Nous avons aussi l'APPI ou l'ionisation résulte de l'interaction entre l'analyte et les photons émis par une lampe décharge. Elle est adaptée à l'analyse de composés apolaires tels que les stéroïdes [227], les pesticides [228], [229] ou les hydrocarbures aromatiques [230].

### Couplage à la chromatographie gazeuse

Pour les couplages GC-MS, les sources d'ions les plus utilisées sont l'EI (Impact électronique) et la CI (Ionisation chimique).

L'EI est une source d'ionisation dure utilisée dans les couplages avec la GC. C'est une technique d'ionisation sous vide qui s'applique aux molécules volatiles de petites tailles et non thermosensibles. L'ionisation est réalisée dans une chambre d'ionisation où règne un vide poussé. Un filament porté à haute température par passage d'un courant émet des électrons. Ces électrons accélérés vers une anode entrent en interaction avec les molécules gazeuses de l'échantillon analysé introduit dans la source et produisent des ions dits radicalaires. La substance doit être à l'état gazeux pour être ionisée. Cette méthode d'ionisation conduit donc à de nombreuses fragmentations en raison de l'énergie élevée du faisceau d'électrons (70 eV). De ce fait l'ion radicalaire n'est pas toujours observé d'où l'utilisation de l'ionisation chimique qui est une méthode d'ionisation plus douce [231], [232].

Dans beaucoup d'études métabolomiques du métabolisme cellulaire des macrophages, les sources d'ions utilisées sont de types ESI. Les ions souvent sont analysés en modes positif et en négatif [221]–[223].

- Analyseurs

Il existe différents types d'analyseur en spectrométrie de masse qui, pour chaque espèce ionique issue de la source d'ionisation, mesurent le rapport entre sa masse et sa charge. Les ions se voient attribuer une valeur  $m/z$  caractéristique qui s'exprime en « Thomson ».

### Analyseurs quadripolaires

L'analyseur quadripolaire est constitué de 4 barres parallèles ayant idéalement une section hyperbolique, disposées symétriquement autour d'un axe. Les potentiels de deux électrodes voisines sont opposés et ceux de deux électrodes opposées sont identiques. Selon le trajet optique, le potentiel est nul. Un ion se déplaçant entre les électrodes est soumis à l'influence d'un champ électrique total. Le trajet des ions dans le quadripôle est oscillant. Si l'amplitude des oscillations est trop grande, les ions ne seront pas détectés. Les tensions sont donc réglées de telle sorte que seul un ion de rapport  $m/z$  choisi puisse atteindre le détecteur. Les principaux avantages de l'analyseur quadripolaire sont sa vitesse de balayage, sa souplesse d'utilisation, son prix et sa facilité de couplage avec différentes interfaces comme la GC et la LC. Sa bonne gamme dynamique en fait un bon outil d'analyse quantitative. Par ailleurs, la

sensibilité est faible pour les ions de masse supérieure à 2000 uma. Il n'est donc pas possible avec un tel système de déterminer les masses exactes des ions.

Il peut arriver que plusieurs analyseurs soient couplés entre eux : Q-Orbitrap, Q-TOF, Q-IT... On parle alors de système hybride. Il y a aussi les systèmes de type triple quadripôle (QqQ). Ces systèmes permettent de faire de la spectrométrie de masse en tandem.

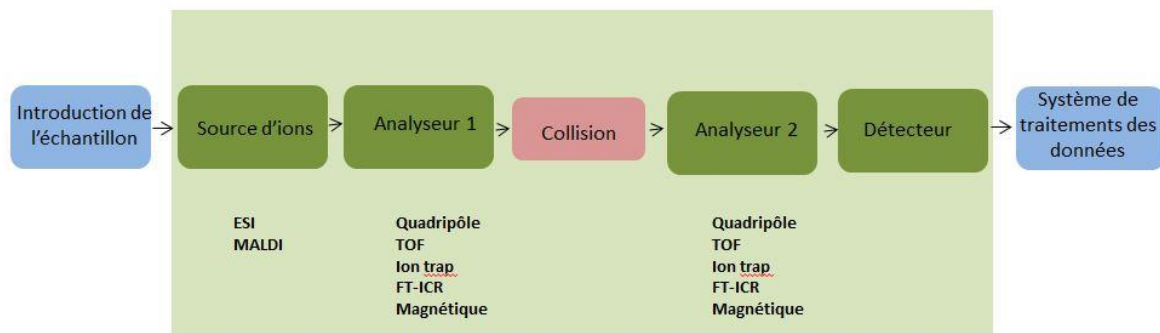


Figure 22 : La spectrométrie de masse en tandem

Il existe deux principaux modes d'acquisitions en spectrométrie de masse : le mode MS et le mode MS/MS. Dans le mode MS l'acquisition peut être effectuée en mode « fullscan » ou SIM (selected ion monitoring). Dans le premier cas, l'ensemble des ions présents seront détectés dans une gamme de masse définie alors que dans le mode SIM il n'y a qu'une liste d'ions prédéfinis qui seront détectés.

La MS/MS ou la spectrométrie de masse en tandem consiste à faire deux opérations de masses successives. L'analyse « MS/MS » peut reposer soit sur des régions distinctes de l'appareil, auquel cas il s'agira d'une MS/MS dans l'espace qui fait appel à deux analyseurs successifs, soit sur des séquences successives au sein d'un même analyseur, il s'agit alors de MS/MS dans le temps.

Le mode d'activation le plus utilisé est le mode CID (collision induced dissociation) ou la fragmentation de l'ion précurseur repose sur des gaz inertes (Argon, Hélium) qui augmentent l'énergie interne par collision jusqu'à dissociation de l'ion.

En fonction de l'information recherchée il existe différents modes de balayage :

- Le balayage d'ions fragments (mode descendant) : un ion précurseur est choisi dans un premier analyseur, il est ensuite dirigé dans une cellule de collision où il sera fragmenté et le

produit de la réaction est observé dans un second analyseur. Elle permet d'identifier une substance inconnue dans un mélange complexe

- Le balayage des ions précurseurs : un ion est sélectionné dans le deuxième analyseur pendant que le premier balaye en rapport  $m/z$  de façon à détecter tous les ions parents capables en se fragmentant de produire l'ion sélectionné. Elle est utilisée pour identifier une famille de molécule ayant une partie de leur structure similaire.

- Le balayage en perte neutre : les deux analyseurs balayent une gamme de masse simultanément avec un décalage de masse constant. On détecte ainsi tous les ions qui en se fragmentant perdent un neutre de masse constante. Elle permet aussi de détecter les familles de molécules ayant une partie de leur structure commune.

- Le mode MRM (*multiple reaction monitoring*) : l'ion parent est sélectionné par le premier analyseur et fragmenté dans la cellule de collision, comme en mode descendant. En revanche, le second analyseur est focalisé sur un ion produit. Ce mode est l'analogue du mode SIR ou SIM (single ion reaction ou single ion monitoring) souvent utilisé en MS simple mais présente une double sélectivité, au niveau de l'ion parent et de l'ion produit. En outre les deux analyseurs étant fixés à des tensions constantes, la sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage, faisant de la MRM un mode de choix pour la quantification [233].

### Orbitrap

L'Orbitrap® est un piège à ions, dans lequel les ions se mettent en orbite à une fréquence dépendante de leur rapport  $m/z$ . Son principe est décrit par Alexander Makarov [234]. L'analyseur de type Orbitrap peut être considéré comme une trappe ionique modifiée dans laquelle le champ de piégeage n'est plus créé à partir d'une électrode annulaire externe au mouvement des ions, mais par une électrode interne fusiforme autour de laquelle les ions vont osciller [235].

La forme particulière des électrodes est en effet inspirée par la forme des champs électriques, les ions sont injectés tangentiellement à ce champ. Le mouvement des ions dans l'orbitrap adopte une trajectoire spirale autour de l'électrode centrale, il est décomposé en un mouvement circulaire qui n'est pas exploitable, et un mouvement axial, dont la fréquence est exploitée pour mesurer la masse par la transformation de Fourier. Ce système nécessite l'utilisation d'un système de stockage d'ions avant de les envoyer vers l'orbitrap. Une C-trap

est utilisé dans notre cas. Les ions produits par la source d'ions en continu, sont d'abord stockés dans un piège linéaire, puis transférés dans la C-trap.

Dans la C-trap règne une pression de diazote de l'ordre du mbar. À la suite de multiples collisions de faible énergie, les ions perdent une grande partie de leur énergie cinétique lors de leur trajectoire courbée dans la C-Trap. Ils sont confinés à l'intérieur de celle-ci par application de potentiels directs de faibles valeurs sur les deux électrodes positionnées de part et d'autre de cet espace de confinement. Après 100 à 200 ns, les ions sont éjectés de la C-Trap, orthogonalement à la trajectoire qu'ils ont adoptée dans celle-ci. L'application d'une impulsion d'une centaine de volts permet de les diriger le plus rapidement et le plus uniformément possible vers l'Orbitrap. Un système de lentilles focalise au mieux le faisceau d'ions vers l'orifice d'entrée de l'Orbitrap sans pour autant annuler totalement l'effet de temps de vol qui va tendre à disperser le nuage ionique, les ions de plus faible rapport  $m/z$  pénétrant les premiers dans l'enceinte de l'analyseur. Un analyseur de type Orbitrap permet d'obtenir des spectres de masse en très haute résolution (140000 contre 4000 pour le quadripôle) et est beaucoup utilisé sur le marché.

Les études métabolomiques permettent de détecter un ensemble de molécules dans des mélanges complexes d'échantillons biologiques sans a priori sur les composés qui s'y trouvent. Certains métabolites peuvent avoir des propriétés structurales et des masses très proches. Une haute résolution permet de séparer deux pics adjacents avec une précision de masse de 1 ppm et permet d'obtenir des valeurs de masse exactes.

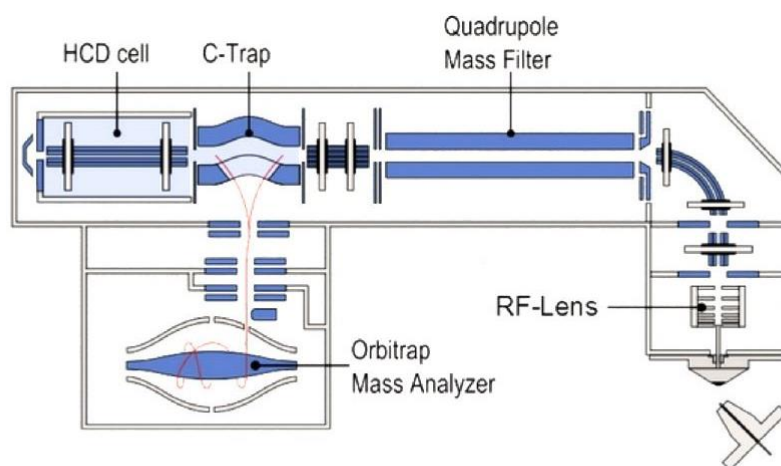


Figure 23 : Q Exactive hybride, spectromètre de masse quadrupole-Orbitrap

Il existe un ensemble d'analyseurs haute résolution tels que le temps de vol (TOF), FT-ICR. Plusieurs méthodes d'analyses métabolomiques sur des macrophages ont été effectuées sur des systèmes Q-TOF [221] et d'autres sur des systèmes Orbitrap [115], [222] ou parfois sur des systèmes de moins bonne résolution tels que les triple quadrupole [223]. Nos analyses ont été réalisés avec l'Orbitrap nous avons donc choisit de détailler son fonctionnement.

Cependant, il existe des limites aux méthodes métabolomiques, comme la présence d'interférences lors de la détection des composés. Les interférences ou contaminants détectés peuvent avoir plusieurs origines : certains sont liés à des utilisations antérieures des instruments et sont donc directement dépendants de chaque laboratoire, d'autres proviennent de conditions analytiques et peuvent donc être commun pour tous les laboratoires de spectrométrie de masse. Ces interférences sont des protéines, des solvants, des polymères, des plastiques et des additifs tels que les détergents. Ces contaminants peuvent représenter une très grande partie du signal détecté, ou parfois plus que la majorité des ions détectés [236].

### 3. Traitement des données en MS métabolomique

Après l'analyse, des données brutes en trois dimensions sont obtenues: Le temps de rétention (Tr), le rapport masse sur charge (m/z) et l'intensité. Pour pouvoir procéder à l'analyse statistique des données, les données en 3 dimensions vont être converties en un tableau à 2 dimensions. Voici le workflow général du retraitement des données jusqu'à l'identification des métabolites et des voies métaboliques dans lesquelles ils interviennent.

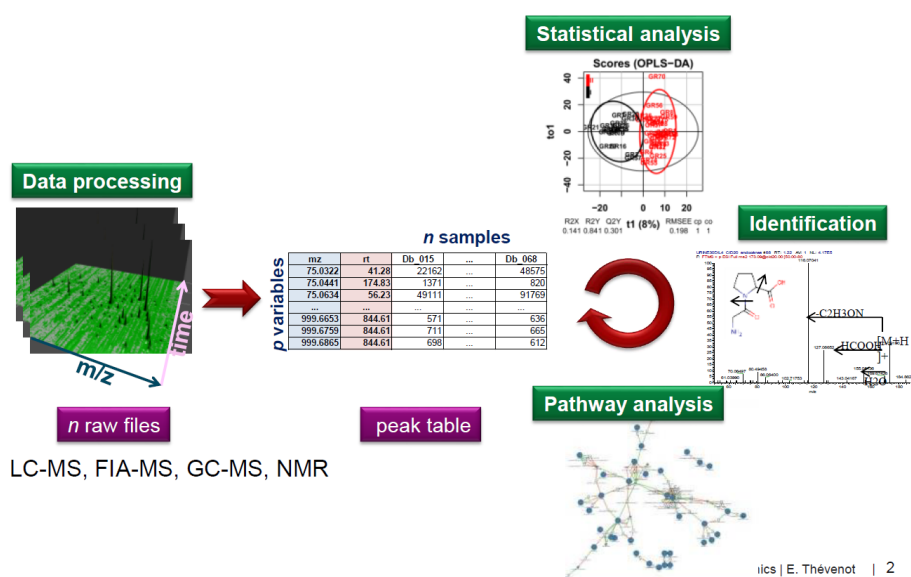


Figure 24 : Workflow général du retraitement des données en métabolomique (E. Thévenot, CEA)

Les fichiers issus de l'analyse en spectrométrie de masse comportent une multitude de données. Pour extraire l'information contenue dans ces fichiers, l'utilisation d'outils informatiques de traitement de données est nécessaire. Pour cela, de nombreux logiciels ont été développés : MarkerLynx<sup>TM</sup> (Waters) [237], XCMS [238], Metalign [239] et Mzmine [240]. Les logiciels de prétraitement ou de statistiques utilisent des formats de données tels que : mzml, mzxml, cdf... Le but commun de ces outils est de détecter l'ensemble des pics de l'analyse chromatographique en les associant aux données de spectrométrie de masse afin de créer une matrice à deux dimensions.

Lors de nos travaux, nous avons utilisé le package XCMS sous R. Le langage R est le langage de programmation et l'environnement mathématique qui a été utilisé pour le traitement de données et pour l'analyse statistique.

**Détection des pics** : Il existe deux algorithmes de détection des pics à savoir MatchedFilter et centWave [241].

Dans nos travaux, nous utilisons l'outil centWave qui répond le mieux aux exigences de la métabolomique actuelle car il est capable de détecter les pics qui se chevauchent partiellement ou qui sont très proches avec une grande précision [241]. La recherche et l'intégration des ions sont aussi appelées en anglais « peak picking ». La fonction xcmsSet permet de détecter les régions d'intérêt (ROI) avec plusieurs paramètres prédéfinis. La fonction « ppm » définit l'écart maximal toléré lors de balayages consécutifs pour la définition des ROI en parties par million. La largeur de pics approximative est définie par la fonction « peakwidth ». Elle est donnée en seconde et sous forme (min, max). Le rapport signal sur bruit est défini par « sntresh ». Lors de la détection des ROI, « Prefilter » permet de faire un préfiltrage en fonction du nombre de pics  $k$  d'intensité  $I$ . Des chromatogrammes d'ions extraits (EIC) peuvent être également obtenus représentant le courant ionique d'un  $m/z$  donné en fonction du temps de rétention sur la colonne. Les EIC peuvent contenir un ou plusieurs pics issus de l'ionisation de différentes molécules.

L'algorithme IPO (*Isotopologue Parameter Optimization*) peut être utilisé dans le but d'optimiser les paramètres de « peak picking » en calculant un score PPS « peak picking score » sur la base des pics isotopiques  $^{13}\text{C}$  naturels et stables. Le PPS est défini comme :  $(\text{nombre de pics fiables (disposant d'un } ^{13}\text{C)}) / ((\text{nombre total de pics}) - (\text{pics de faibles intensités}))^2$ . Le résultat du traitement des données XCMS dépend fortement des réglages des paramètres. Il permet également d'optimiser les paramètres de regroupement entre les pics offrant ainsi une meilleure détection en fonction des paramètres LC-MS utilisés [242].

**Groupement et alignement des temps de rétention**: Un même composé peut être présent dans plusieurs échantillons à différents temps de rétention et ceci peut être dû à l'encrassement de la machine ou à des variations des conditions analytiques au cours des différentes séries. Cette étape a pour objectif le regroupement de signaux identiques entre différents échantillons, malgré de faibles décalages en rapport  $m/z$  ou en temps de rétention qui peuvent exister. Cette étape permet donc d'aligner les signaux « features » entre échantillons différents. Il existe là encore plusieurs algorithmes d'appariement dans XCMS (group.density, group.mzclust, group.nearest). Nous allons détailler ici celui utilisé lors de ce travail de thèse à savoir group.density. L'algorithme group.density va appairer les pics en tenant compte des deux dimensions de la LC-MS :  $T_r$  et  $m/z$ . Le paramètre « bw » est défini comme l'écart maximal de temps prévu entre les échantillons. « mzwid » est la distance pour laquelle les  $m/z$



correspondent à un même composé. Il est utilisé pour regrouper les pics dans un domaine de masse. « minsamp » est le nombre d'échantillons dans lequel un pic doit être retrouvé et « minfrac » est la fraction minimale où un pic doit être retrouvé dans au moins un groupe d'échantillon pour être considéré comme un véritable pic. Cette étape permet le filtrage des faux-positifs.

GroupCorr permet de grouper les pics selon la similarité des formes extraites du chromatogramme. « missing » représente le nombre d'échantillons manquants pour permettre des groupes de correction des temps de rétention et « extra » le nombre de pics supplémentaires pour permettre la correction des temps de rétention. L'étape de correction des temps de rétention est souvent suivie d'un second groupement.

Une fois cette étape effectuée, nous nous retrouvons avec un tableau à deux dimensions résumant l'information contenue dans les échantillons où sont regroupés les pics présents et absents.

**Traitement des valeurs manquantes** (*fill in missing peak data*) : Cette étape permet de rattraper des pics non détectés en raison de bruit de fond trop important ou de la forme de pic chromatographique atypique. Les valeurs manquantes sont remplacées par les valeurs du bruit de fond local. Fillpeaks permet donc de parcourir l'ensemble des pics manquants et de les intégrer dans la matrice finale dans le but d'avoir des matrices de données statistiquement utilisables. Les « 0 » dans les matrices de données peuvent altérer le caractère discriminant des variables. En fonction du type de données deux méthodes sont utilisées : « chrom » pour les données issues de la LC ou de la GC-MS et « MSW » pour les pics sans information sur le temps de rétention.

**Normalisation** : L'objectif de la normalisation est de supprimer les biais expérimentaux tout en conservant les variations liées aux effets biologiques. Il peut y avoir des phénomènes de suppression d'ions dus à l'encrassement de la source. On peut utiliser des composés de références (étalons internes ou externes) pour normaliser l'ensemble du chromatogramme. Des contrôles qualités (QC) composés d'un mélange des différents composés injectés sont alors injectés régulièrement tout au long de la séquence analytique. Le biais pourra ainsi être corrigé avec les différentes stratégies de correction existantes : « Linear, loess, Lowess, all loess pool, all loess sample ». Il s'agit pour chaque variable, d'ajuster un modèle de régression aux valeurs des QC dans le but d'ajuster l'intensité des échantillons. Pour « linear, lowess, loess » le modèle de régression de la correction est conditionné par les mesures des

QC. Pour les méthodes de correction « all loess pool, all loess sample » la correction est basée sur l'intensité des échantillons [243].

En métabolomique cellulaire, il est important de normaliser les données par rapport aux nombres de cellules ou en quantifiant la teneur en protéine totale. La précision des techniques de comptages n'est pas toujours exacte en raison des pertes lors des processus de grattage, d'aliquotage ou de transfert des cellules. La quantité de protéine présente dans les échantillons peut être déterminée par des méthodes colorimétriques mais cette technique de normalisation présente elle aussi des limites en raison de la faible capacité de récupération des protéines dans les solvants compatibles avec la spectrométrie de masse. Cependant, différentes méthodes de normalisation utilisant des marqueurs métaboliques spécifiques sont actuellement en train d'être explorées [244].

**Pré-annotations :** CAMERA est un algorithme qui permet une pré-annotation ( $[M+K^+]$ ,  $[M+Na^+]$ ,  $[M-C_3H_9N]$ ...) des pics générés par XCMS sur la base des pics des isotopes et des adduits et de proposer une masse de composé précise même dans des données extrêmement complexes [245].

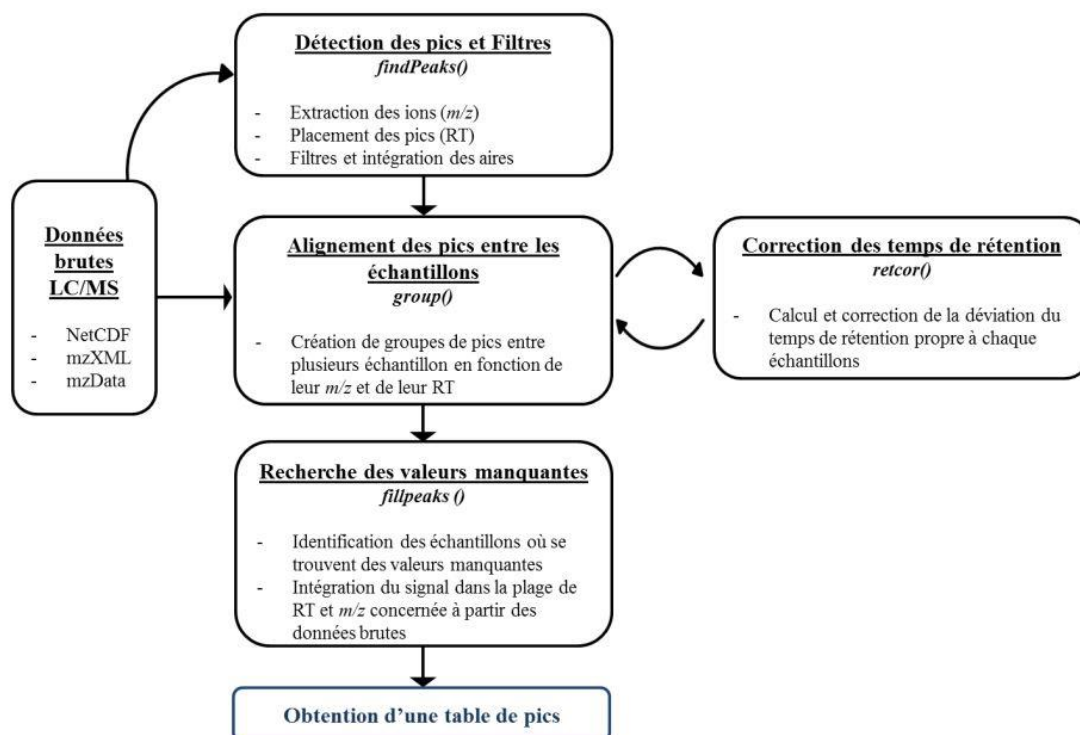


Figure 25 : Traitement des données LC-MS brutes par XCMS adapté de Smith *et al* [238]

#### **4. Analyses statistiques**

Une panoplie de méthodes statistiques et chimiométriques sont disponibles pour exploiter les grandes quantités de données générées par l'analyse métabolomique.

- Les analyses univariées : Il existe aussi un ensemble de tests univariés que l'on utilise si les données ne sont relatives qu'à une seule variable (concentration, ordre d'injection, âge, IMC...). Le type de test utilisé dépend de la nature et la variable à étudier. Le t-test de Student ou corrélation de Spearman (calcul de corrélation) ou l'analyse de variance à un critère ANOVA (calcul de variance) sont souvent utilisés dans ce type d'analyse. Ils ont cependant une limitation importante qui est que l'échantillon de données soit de distribution normale et ne comporte pas trop de données extrêmes. Si elles ne remplissent pas ces conditions les données sont dites non paramétriques et les tests statistiques seront remplacés par les tests proposés par Wilcoxon et Kruskal Wallis.

- Les analyses multivariées permettent de synthétiser et de visualiser rapidement une grande quantité d'informations en projetant les données initiales dans un espace de données réduit. Elles ont pour but de sélectionner les variables d'intérêt lors d'une analyse métabolomique.

Les échantillons, les variables, les identifiants ainsi que les descripteurs métabolomiques sont alors rassemblés dans des tableaux appelés matrice de design et matrice de données. Ces tableaux sont ensuite normalisés de différentes façons pour ne pas que la disparité des intensités, les différences potentielles d'unité de mesure ou d'échelle biaisent les résultats des analyses multivariées. Une manière de faire est de centrer les données (soustraire la moyenne) pour déplacer la distribution autour du zéro. Une normalisation de type Pareto est aussi utilisée. Dans ce dernier cas, il s'agit de soustraire par la moyenne et diviser par le carré de l'écart type afin de limiter la dilution du signal analytique et ainsi minimiser les signaux du bruit de fond.

Les données peuvent être soumises à des analyses statistiques multivariées descriptives (Ex : analyse en composante principale, ACP) ainsi qu'à des analyses statistiques explicatives et prédictives (ex : analyse discriminante PLS, PLS-DA).

- Les analyses statistiques descriptives non supervisées n'ont pas d'a priori sur les échantillons. L'ACP constitue un bon point de départ à l'analyse exploratoire des données. C'est une méthode de projection qui permet de décrire et de représenter un jeu de données métabolomiques caractérisé par un grand nombre de variables. On construit un certain nombre de composantes principales qui permettent de comprendre

la variabilité des jeux de données. Chaque composante restitue un pourcentage expliqué de la variabilité totale. Elle est souvent suivie d'une analyse dite explicative dans le but d'approfondir l'interprétation des données et d'identifier les variables responsables de la séparation des groupes.

- Dans le cas des analyses explicatives des informations sont données sur la nature des échantillons. Il y a la méthode de régression classique dites des moindres carrées ou « OLS » (ordinary least Squares) ainsi que la régression linéaire PLS (partial least square). La régression PLS fournit un modèle mathématique qui permet d'expliquer une ou plusieurs variables Y en fonction d'une matrice de variables expérimentales X. Elle présente l'avantage de s'accommoder de données manquantes contrairement à l'ACP et permet la construction de modèles prédictifs quand les variables sont nombreuses et fortement corrélées entre elles. Comme l'ACP, la représentation est faite sous forme de « score plot » ou carte factorielle. Une variante de la PLS, la PLS-DA (*partial least square-discriminant analysis*), permet de maximiser la séparation des groupes. Pour une PLS la variable Y est quantitative alors que dans le cas de la PLS-DA elle est qualitative ou catégorielle. Comme la PLS, elle permet d'isoler les métabolites dont l'intensité est caractéristique d'un état biologique donné et qui contribuent à la séparation des différents groupes.

Il y a aussi un ensemble de tests statistiques qui permettent d'analyser les données répétées. Selon la distribution des données (normalité) ou l'appariement des échantillons, une panoplie de tests statistiques est à disposition.

## 5. Annotations des métabolites

L'annotation et l'identification des métabolites sont des étapes fastidieuses du processus d'analyse métabolomique. Le *Metabolomics Standards Initiative* (MSI) décrit l'annotation des métabolites en 5 niveaux [246].

Le niveau 0 pour les **composés formellement identifiés en incluant la stéréochimie** des molécules. C'est le niveau d'annotation le plus fiable [247].

Le niveau 1 pour les **composés formellement identifiés**. Les composés sont identifiés par rapport à un étalon chimique de référence. Généralement, il s'agit de la même molécule et de son standard deutéré. La molécule d'intérêt et les standards sont analysés dans les mêmes conditions analytiques et la comparaison est faite sur la base de plusieurs critères : Tr, m/z, spectre MS/MS...). À ce niveau, la probabilité d'analyse est élevée mais l'identification des stéréo-isomères reste une limitante qui peut être contournée en utilisant des méthodes de séparations spécifiques des stéréo-isomères [246], [248], [249].

Le niveau 2 pour des **composés prétendument annotés** sans utilisation d'étalon interne, elle se fait sur la base des similitudes spectrales avec des bibliothèques spectrales publiques ou commerciales.

Le niveau 3 pour l'identification des **composés prétendument caractérisés**. L'identification est faite en fonction des propriétés physico-chimiques caractéristiques d'une classe de composés chimiques, ou par similarité spectrale avec des composés connus d'une classe chimique. On dispose de la masse exacte, du temps de rétention et de la famille moléculaire. Elle est pour les composés pour lesquels les banques de données ne proposent pas de structure chimique.

Les niveaux 2 et 3 restent présomptifs. Ils se basent sur deux ou trois critères. En GC-EI-MS, les spectres de masses présents dans les bases de données servent pour une annotation putative car le modèle de fragmentation est souvent reproductible sur plusieurs plateformes. En LC-MS le m/z avec une forte précision de masse est souvent utilisé lors des recherches dans les bases de données. Dans ces deux niveaux, la non utilisation d'étalon interne laissent l'identification des métabolites qui en résulte putative [246], [248], [249].

Le niveau 4 pour les **composés dits « inconnus »** qui bien que non identifiés. La seule information dont on dispose à ce niveau est la masse exacte et le temps de rétention des molécules [246], [248], [249].

Il existe de nombreuses bases de données métabolomiques, parmi lesquelles HMDB, KEGG, PubChem et ChemSpider qui sont parmi les plus grandes bases de données. Il existe aussi des bibliothèques de spectre de masse tels que : le NIST (*National Institute of Standards and Technology*), GMD (*Golm Metabolome Database*), mzcloud... Ces bibliothèques sont limitées par le fait qu'elles ne contiennent pas tous les métabolites. Des outils *in silico* sont en train d'être mise en place pour prédire les modèles de fragmentation de masse et les Tr [250]. Ces outils fourniront des quantités croissantes de données à intégrer aux bibliothèques spectrales de masse pour faciliter l'identification de métabolites. Il existe une grande quantité de métabolites qui ne sont pas tous répertoriés dans les bases de données. Le métabolome humain est complexe et contient un ensemble de métabolites endogène et exogène provenant de l'environnement externe. Sans l'identification de tous les métabolites, il est impossible de fonder le raisonnement biologique sur les ensembles de données ou famille de molécule. L'identification des métabolites discriminants spécifique d'une perturbation est suivie d'une interprétation biologique avec identifications des voies métabolomiques impliquées.

## **6. Identifications des réseaux métaboliques**

Cette partie est la dernière du questionnement biologique. Le but est d'identifier les voies métaboliques d'intérêt. Le réseau métabolique est divisé en plusieurs dizaines de voies métaboliques. Dans cette partie, on cherche à définir les voies métaboliques auxquelles appartiennent les métabolites significatifs lors des analyses statistiques. Un métabolite peut appartenir à plusieurs voies différentes. Dans un « workflow » classique de métabolomique, les pics statistiquement significatifs sont identifiés grâce à la spectrométrie de masse en tandem avant d'être placé dans un réseau métabolique.

Une nouvelle approche pour prédire l'activité biologique a été développée pour les sciences omics. Des méthodes d'enrichissement sont utilisées. Il s'agit de tester pour chaque voie si le nombre de métabolites appartenant à cette voie est significatif. Des outils comme MetaboAnalyst [251] sont utilisés pour interpréter les réseaux métaboliques à partir de données de spectrométrie de masse non ciblée. Dans cet outil, un algorithme appelé mummichog utilise le calcul d'enrichissement pour prédire les voies métaboliques impliquées à partir des données de haute résolution de la spectrométrie de masse sans effectuer une annotation précise des pics au préalable. L'approche mummichog cartographie toutes les correspondances métabolites possibles avec le réseau et recherche l'enrichissement local en se basant sur les P-value des molécules, qui reflète l'activité réelle en contournant l'étape d'identification des pics. Elle ne remplace pas la spectrométrie de masse en tandem utilisé conventionnellement pour identifier les molécules mais permet aux chercheurs de se concentrer sur une famille de molécules pour améliorer leur niveau d'identification [252].

## OBJECTIF DE LA THÈSE

**Etat des lieux** : les macrophages pulmonaires sont des cellules immunitaires impliquées dans la physiopathologie des maladies pulmonaires inflammatoires telles que l'asthme et essentielles pour la défense contre les agents pathogènes qui colonisent les voies respiratoires. Les macrophages peuvent subir une polarisation vers deux phénotypes appelés M1 et M2. Le phénotype M1 est induit par les agonistes des Toll-like Récepteurs (TLR) et promeut la réponse inflammatoire tandis que le phénotype M2 est induit par les cytokines Th2 canoniques IL-4 et exerce principalement des fonctions immunorégulatrices. Cette différenciation se traduit par des modifications du phénotype (expression de protéines de membrane, production de cytokines) et des fonctions cellulaires (phagocytose...), mais la polarisation a aussi un impact sur le métabolisme et la production de médiateurs intracellulaires. Par exemple, les oxystérols ont été récemment décrits comme jouant un rôle important dans la réponse inflammatoire des macrophages aux agonistes des TLR. Une augmentation de la population de macrophages M2 a été décrite dans les maladies telles que l'asthme, la BPCO ou le cancer pulmonaire, et des altérations de la polarisation et de la fonction des macrophages existent également au cours de la mucoviscidose. La polarisation des macrophages fait l'objet de recherches intensives, mais les modifications du métabolisme cellulaire pendant la polarisation des macrophages pulmonaires humains n'ont jamais été explorées. Nos objectifs étaient d'étudier le métabolome des macrophages pulmonaires humains pendant la polarisation M1/M2, d'évaluer les altérations métaboliques et d'évaluer les effets d'agents pharmacologiques sur les changements métaboliques induits par la polarisation.



**Premier objectif :** La première partie de la thèse a consisté à développer une méthode optimale de préparation d'échantillon et d'acquisition des données non ciblée par LC-MS et GC-MS et des méthodes de traitement de données adaptés. Dans cette partie, différentes méthodes de chromatographie ont été testées avec plusieurs types de colonnes chromatographiques. La spectrométrie de masse a aussi été optimisée en testant plusieurs paramètres de source et d'acquisition.

**Deuxième objectif :** Les méthodes d'analyse et de retraitements ont été appliquées à un modèle *in vitro* de polarisation M1/M2 avec des macrophages pulmonaires humains. afin de mieux caractériser les mécanismes de l'inflammation pulmonaire et de sa résolution.

**Troisième objectif :** Il est apparu que certains oxysterols étaient des médiateurs clés de l'inflammation notamment le 25-Hydroxycholesterol. Dans cette partie une analyse ciblée de la voie des oxysterols par GC-MS a été développée pour caractériser les altérations de la voie des oxysterols au cours de la polarisation M1/M2.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## I. Cultures cellulaires et échantillonnage

### 1. Dissection du poumon et isolement des cellules.

L'accord du Comité Consultatif pour la protection des personnes participant à la recherche biomédicale de Versailles a été obtenu pour le travail sur tissus pulmonaires humains. Les macrophages proviennent des pièces de lobectomie et de pneumonectomie pour cancer bronchique prélevées à distance de la tumeur à l'hôpital Foch (Suresnes, France).

Les macrophages pulmonaires ont été isolés selon une technique préalablement décrite [253], [254]. Ils ont été obtenus à partir d'un fragment de parenchyme pulmonaire prélevé à distance de la tumeur, lavés dans du milieu RPMI supplémenté en L-Glutamine (2 mM) et en antibiotiques (100 µg/mL de streptomycine et 100 U/ml de pénicilline) puis finement découpés et lavés de nouveau. Le liquide de lavage obtenu est ensuite centrifugé (2000 rpm, 10 min, 25°C) et le culot remis en suspension dans du milieu supplémenté, en présence de 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté.

La technique de culture des macrophages a été validée par des travaux antérieurs du laboratoire et mis au point d'après un protocole déjà publié [253] avec quelques modifications.

La suspension cellulaire a été ajustée à  $10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup> et 1 mL de cette suspension a été déposé dans chaque puits d'une plaque 24 puits et mis à incuber 1h30 à 37°C en atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Durant cette étape, les macrophages adhèrent sur le support plastique. Au bout du temps imparti, les cellules non adhérentes ont été éliminées par trois rinçages successifs au RPMI. Après vérification au microscope inversé de l'absence de globules rouges, 1 mL de milieu RPMI supplémenté contenant 10% de SVF a été ajouté dans chaque puits, et la plaque a été maintenue à l'étuve pendant une nuit. Il a été démontré par une technique de microscopie optique après coloration par la méthode de May-Grünwald-Giemsa ainsi que par immunohistochimie avec marquage par un anticorps anti-CD68 (anticorps monoclonal humain anti-CD68, Dako, Trappes, France), que la population de cellules adhérentes isolée par cette technique était constituée à plus de 95% par des macrophages. La

viabilité cellulaire observée après marquage des cellules mortes au bleu trypan était supérieure à 90%.

## **2. Traitement des macrophages**

Au lendemain de l'isolement des macrophages pulmonaires, ces derniers ont été lavés avec du RPMI supplémenté en antibiotiques et glutamines, puis 1 mL de milieu RPMI complet (1% de SVF) a été déposé dans chaque puits. Les macrophages ont ensuite été traités avec différentes molécules pharmacologiques et de nouveau laissés 1h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

Au terme de cette heure, le LPS (10 ng.mL<sup>-1</sup>) et l'IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>) ont été ajoutés au milieu de culture afin de favoriser la différenciation des macrophages vers un profil M1 (LPS) ou M2 (IL-4). Après 24h d'incubation, les macrophages ont dans un premier temps été comptés au microscope inversé afin de déterminer la concentration cellulaire. Dans un second temps, les surnageants ont été collectés et centrifugés à 2000 rpm pendant 5 min à 4°C puis congelés à -20°C.

## **3. Récupération des cellules**

Les macrophages adhérents au fond des puits ont été rincés deux fois au PBS stérile (+4°C). Pour l'analyse en LC-MS les macrophages sont récupérés avec un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (1/1) 500 µl par condition finale. Pour l'analyse GC-MS un mélange ACN/isopropanol (IPA)/H<sub>2</sub>O (3/3/2) est utilisé et nous nous retrouvons avec 1 mL final par condition. Les plaques sont laissées à -80°C pendant 20 min avant d'être grattées pour récupérer les cellules qui seront ensuite gardées à -80°C jusqu'à l'analyse métabolomique.

## **II. Matériels**

L'acide formique (98%), le carbonate d'ammonium et l'hydroxyde d'ammonium ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile, le chloroforme et l'eau ont été achetés auprès de Fisher Scientific (Illkirch, France). Les étalons internes FAME pour la GC-MS ont été achetés chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Les étalons internes deutérés pour l'analyse LC-MS ont été achetés chez Bertin technologies (St. Louis, MO, USA).

### III. Méthodes de spectrométrie de masse : étude non ciblée

#### 1.1. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

##### a. Préparation des échantillons

###### *Étalons internes*

Voici la liste des étalons internes deutérés utilisés et leurs concentrations : anandamide-d<sub>4</sub>, 25-hydroxycholesterol-d<sub>6</sub>, 2-arachidonoylglycerol-d<sub>8</sub>, hydrocortisone-d<sub>4</sub> and glyburide-d<sub>3</sub>, 0.5 mg/L et fludrocortisone-d<sub>2</sub>, testosterone-d<sub>3</sub>, propoxyphene-d<sub>5</sub>, chlorpromazine-d<sub>3</sub> et fluoxetine-d<sub>6</sub>, 0.05 mg/L. 10 µL de ce mélange ont été ajoutés dans chaque échantillon.

###### *Extraction*

Une extraction liquide/liquide a été effectuée avec 1 mL d'un solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1/2/1) selon la procédure décrite par Fei *et al.* Le mélange est soit mis à soniquer pendant 10 minutes suivi d'une agitation de 10 minutes (pour le milieu intracellulaire) ou vortexé pendant 30 secondes et agité pendant 20 minutes (pour le milieu extracellulaire ou le plasma). Il s'en suit une centrifugation de 5 min à 10 000 rpm. Nous nous retrouvons alors avec deux fractions : La phase supérieure contenant les moléculaires polaires et la phase inférieure où se retrouvent les composés non polaires. Deux fois 200 µL de chaque phase sont récupérés. Les échantillons ont ensuite été séchés sous vide avec évaporateur. Les deux fractions de la phase polaires ont été reprises avec un tampon formiate/acétonitrile (20/80) et un tampon carbonate/acétonitrile (20/80) pour l'analyse en mode positif et négatif avec la colonne HILIC. Les deux fractions inférieures qui seront analysées en positif et en négatif avec une colonne C<sub>18</sub> ont été reprises avec des tampons formiate/acétonitrile (80/20) et carbonate/acétonitrile (80/20). Les échantillons sont ensuite transférés dans des vials avec insert pour l'analyse en LC-MS.

##### b. Séparation chromatographique

Nous avons travaillé avec un système HPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo, USA) couplé à un spectromètre de masse Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Scientific Dionex, Les Ulis, France). Le système est calibré avant chaque utilisation à l'aide d'une solution fournie par le fabricant, permettant de garantir une résolution < 3ppm durant l'analyse. La séparation chromatographique est réalisée avec 2 types de colonnes.

Tableau 3. Conditions LC-MS pour l'analyse

Paramètres	Conditions
<b>Système</b>	<b>HPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo, USA)</b>
Colonne	SeQuant® 4.6 mm × 150 mm, 5µm i.d. ZIC-pHILIC, AIT France, Houilles, France
Température	40°C
Debit	300 µL/min
Volume injecté	10 µL
Temps d'analyse	40 min
	<b>Mode d'ionisation : ESI +</b>
<b>HILIC</b> Phase mobile A	Tampon formiate (10 mM, pH 3.8)
Phase mobile B	Acétonitrile
Gradient d'élution	95% de B pendant 3 min, de 95% à 5% pendant de B jusqu'à 25 min, 5% de B pendant 5 min, 95% de B pendant 10 min
	<b>Mode d'ionisation : ESI -</b>
Phase mobile B	Acétonitrile
Phase mobile C	Carbonate d'ammonium (20 mM, pH 9.2)
Gradient d'élution	8% de C pendant 3 min, de 8% à 92% pendant de C jusqu'à 25 min, 92% de C pendant 5 min, 8% de C pendant 10 min
Colonne	2.1mm × 100 mm, 1.9 µm C <sub>18</sub> Hypersil Gold (ThermoFisher)
Température	40°C
Debit	300 µL/min
Volume injecté	10 µL
Temps d'analyse	40 min
	<b>Mode d'ionisation : ESI +</b>
<b>RP</b> Phase mobile A	Tampon formiate (10 mM, pH 3.8)
Phase mobile B	Acétonitrile
Gradient d'élution	10% de B pendant 3 min, de 10 % à 90% pendant de B jusqu'à 25 min, 90% de B pendant 8 min, 10% de B pendant 5 min
	<b>Mode d'ionisation : ESI -</b>
Phase mobile B	Acétonitrile
Phase mobile C	Carbonate d'ammonium (20 mM, pH 9.2)
Gradient d'élution	90% de C pendant 3 min, de 90 % à 5% pendant de C jusqu'à 25 min, 5% de C pendant 8 min, 90% de C pendant 5 min

### c. Paramètres de source

Différents paramètres de sources ont été testés lors de cette analyse. Compte tenu de la grande diversité physico-chimique des métabolites, différents paramètres de source permettant d'ioniser le plus grand nombre de molécules ont été optimisés et les résultats seront présentés dans la première partie.

### d. Paramètres d'acquisition

La résolution du spectromètre de masse a été fixée à 70 000. L'AGC target (contrôle automatique du gain) qui correspond au nombre d'ions présents dans la trappe d'ions de l'Orbitrap a été fixé à  $10^6$ . L'idée est de réguler le nombre d'ions dans l'analyseur de masse afin d'éviter ou de minimiser les effets de charge spatiale pour améliorer la précision de masse [255]. La valeur de L'AGC target est corrélée avec la valeur du maximum IT (temps d'injection) qui est de 256 ms. Des comparaisons ont été effectuées entre plusieurs méthodes d'acquisitions. Les échantillons de surnageants et de cellules ont été acquis avec une méthode segmentée en 3 plages m/z (60-300 ; 300-600 ; 600-900). La S-lens RF est de 100, l'énergie de voltage de 4000 V, la température de vaporisation de 100°C, le « sheath gas » de 40 et « aux gas » de 25.

### e. Analyses des données

**Conversion** : les fichiers bruts ont été obtenus sous Xcalibur et converti au format MzML avec msConvert (ProteoWizard 3.0.18108 64-bit) avec les options de filtre : peakPicking cwt msLevel=1-1 pour la centroidisation des données et simAspectra qui écrit les données de spectrométrie de masse [256].

**Prétraitement** : les fichiers au format mzML ont ensuite été traités à l'aide du package XCMS [238] et du package CAMERA [245] sous R. À l'exception du « fullscan », des versions modifiées de XCMS et de CAMERA ont été utilisés.

XcmsSet permet la détection et l'intégration automatique des pics, « fillpeaks » le remplissage des pics manquant, groupCorr permet de grouper les pics selon la similarité des formes extraites du chromatogramme. Ces trois fonctions sont les seules utilisant directement les données brutes donc celles qui nécessitent des modifications pour traiter les données segmentées. Les paramètres XCMS ont été optimisés avec l'algorithme IPO. Les paramètres (snthresh, peakwidth , prefilter = c (K, I)) ont été donc optimisé pour chaque type de colonne

et de matrice et l'algorithme CentWave et été utilisé pour la sélection automatique des pics. L'étape d'alignement a été réalisée avec la méthode `group.density` (`bw = 5`, `mzwid = 0,01`, `minfrac = 0,5`) et la méthode `retcor.loess` (`missing = n_blank + 1`, `extra = 1`). Nous avons pré-annoté avec CAMERA en incluant les fonctions `groupFWHM`, `findIsotopes`, `groupCorr` (modifiée) et `findAdducts`, avec les paramètres par défaut. Des versions modifiées de certaines fonctions de XCMS et CAMERA ont été développées par Natacha LENNUZA (CEA).

**Filtrage** : plusieurs filtres ont été utilisés pour limiter le nombre de faux positifs détectés de manière inhérente par XCMS. Les plateformes W4M et métaboAnalyst ont été utilisées pour filtrer et faire l'analyse statistique de nos données.

Premièrement, tous les pics avec un temps de rétention en dehors de la fenêtre de 3 à 30 minutes (correspondant à la «phase de gradient») ont été éliminés, car ils correspondent le plus souvent à des faux positifs détectés à tort par XCMS dans des solvants (ce filtre n'a été appliqué que pour les échantillons analysés lors de l'optimisation des paramètres de tune). Ensuite, les pics détectés dans les échantillons de blanc d'intensité supérieure à 3 fois l'intensité moyenne observée dans les échantillons biologiques ont également été filtrés (filtre Blank-over-Bio-ratio). Les échantillons ayant un CVpool supérieur à 30% ont été supprimés. Des «`determineBatchCorrection`» ont été appliquées afin pour regarder si beaucoup de variables seront concernés ou non par une correction de la dérive. En fonction des résultats différents types de corrections ont été appliquées.

## 1.2. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

### a. Préparation des échantillons

Pour l'analyse non ciblée des échantillons en GC/MS, nous nous sommes basés sur le protocole de Fiehn 2016 [197]. Nous avons travaillé sur le métabolome intracellulaire et extracellulaire. Le solvant d'extraction est un mélange 3/3/2 (v/v/v) IPA/ACN/H<sub>2</sub>O purgé au diazote afin d'éviter les d'oxydations et conservé à -20°C.

#### *Étalons externes*

Une solution composée de 2/5/2 (v/v/v) H<sub>2</sub>O/MeOH/IPA nommée *solution A* sera utilisée pour dissoudre certaines molécules et pour préparer le mélange de contrôles qualité (CQ) externes. Un mélange de molécules a été utilisé à des concentrations listées sur le tableau suivant :

Tableau 4. Préparation des standards : mélange de référence « CQ externe

Composés	Solvant	Poids (mg)
Pyruvate	Eau	10
Alanine	Eau	10
Valine	Eau	10
Serine	Eau	10
Acide nicotinique	Eau	10
Acide succinique	Eau	10
Méthionine	Eau	20
Acide aspartique	Solution A	20
4-Hydroxyproline	Eau	10
Acide salicylique	Eau	10
Acide glutamique	Solution A	10
Créatinine	Eau	10
Acide alpha-ketoglutarique	Eau	10
Asparagine	Eau	10
Putrescine	Eau	10
Acide shikimique	Eau	10
Acide citrique	Eau	10
Lysine	Eau	10
D-(+)-Glucose	Eau	10
Glucose-6-phosphate	Eau	10
Acide arachidique	Chloroforme	10
Sérotinine	Methanol	10
Adenosine	Solution A	10
Sucrose	Eau	10
Acide chlorogénique	Methanol	10
Alpha-tocopherol	Chloroforme	10
cholesterol	Chloroforme	10



Pour l'acide aspartique, 20 mL de solution A (1 mg/mL final) ont été ajoutés, et du NaOH 0,2 M par fractions de 5 µL en vortexant jusqu'à disparition des cristaux. Pour l'acide glutamique et l'adénosine 10 mL de solution A (1 mg/mL final) ont été utilisés. Les autres molécules ont été dissoutes entre 1 et 1.5 mL de solvants adéquats. Les molécules ont ensuite été rassemblées et nous avons ajouté de la solution A pour atteindre un volume finale de 250 mL. Le mélange a été agité pendant 30 min ou plus sur un agitateur magnétique pour dissoudre complètement tous les composés. Cette solution est conservable à 4°C.

Pour préparer nos 6 niveaux de CQ externes, nous avons ajouté 10 mL de la solution A a 2,5 mL de cette solution pour le diluer et avoir une solution finale à 10 µg/mL.

QC6: 50 µL (500 ng de chaque composé)

QC5: 25 µL (250 ng)

QC4: 10 µL (100 ng)

QC3: 5 µL (50 ng)

QC2: 2,5 µL (25 ng)

QC1: 1,0 µL (10 ng)

### *Étalons internes*

12 esters méthyliques d'acides gras (FAMES) ont été utilisés comme standards internes :

Tableau 5. Préparation des standards : étalons internes

Composés	Poids (mg)	Concentration (mg/mL)
Methyl caproate/hexanoate (C06)	20	0.8
Methyl caprylate/octanoate (C08)	20	0.8
Methyl caprate/decanoate (C10)	20	0.8
Methyl laurate/dodecanoate (C12)	20	0.8
Methyl myristate/tetradecanoate (C14)	20	0.8
Methyl hexadecanoate palmitate (C16)	20	0.8
Methyl stearate/octadecanoate (C18)	10	0.4
Methyl arachidate/icosanoate (C20)	10	0.4
Methyl behenate/docosanoate (C22)	10	0.4
Methyl tetracosanoate (C24)	10	0.4
Methyl hexacosanoate (C26)	10	0.4
Methyl triacontanoate (C28)	10	0.4

Les molécules sont dissoutes individuellement dans 1 mL de chloroforme et ensuite nous avons rajoutés du chloroforme pour atteindre un volume final de 25 mL. Les FAMES sont stockés à 4°C dans de la verrerie ambrée.

### *Extraction et purification des échantillons*

1 mL de solvant d'extraction refroidi dans un tube a été ajouté à chaque échantillon et dans les pools d'échantillons qui vont nous servir de CQ. Les échantillons sont ensuite vortexés pendant 10 sec et agités pendant 5 min à 4°C. Les échantillons ont été centrifugés pendant 2 min à 14 000 g à température ambiante. 450 µL de solution ont été récupérés puis séchés sous vide. Ensuite les échantillons ont été resuspendus dans 450 µL d'un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (1/1) purgé avec du diazote à température ambiante. Après 2 min de centrifugation à 14 000 g à température ambiante, les échantillons ont été transférés dans un tube de polypropylène et évaporés sous vide.

### *Dérivation d'échantillons*

Nous avons préparé une solution de methoxyamine MeOX à 20 mg/mL dans de la pyridine que nous avons vortexé puis soniqué à 60°C pendant 15 min pour dissolution.

10 µL de MEOX ont été ajoutés à chaque échantillon, chaque CQ, chaque blanc, et chaque pool d'échantillons. Tous les échantillons ont été agités à vitesse maximale avec l'aide d'une plaque chauffante pendant 1,5 h à 30°C. Enfin, 75 µL de N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (MSTFA) mélangé avec les FAMES (10 µL de FAME pour 1 mL de MSTFA) ont été ajoutés aux extraits maintenus à 37°C pendant 30 min. Après la dérivation, les échantillons ont été immédiatement transférés dans des vials en verre avec des inserts pour injection.

### **b. Paramètres de spectrométrie de masse et de chromatographie**

La chromatographie en phase gazeuse a été réalisée sur un système Trace 1300 (Thermofisher) équipé d'un autosampler TriPlus 100 LS (Thermofisher). Le système est lié à un détecteur triple quadripôle TSQ 8000 (Thermofisher). Une colonne Uptibond 5 Premium 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Interchim, Montluçon, France) a été utilisée. L'hélium a servi de gaz vecteur à un débit de 1 mL/min dans le mode d'écoulement. Le volume d'injection était de 1 µL. La programmation de température était la suivante : 60°C pendant une minute, une rampe de 10°C par minute jusqu'à atteindre 325°C, ensuite la température est maintenue à 325°C pendant 10 minutes. Ceci nous faisait un temps d'acquisition total égal à 37.5 minutes. Nous avons choisi l'impact électronique comme source d'ionisation et les températures pour le spectromètre de masse étaient de : 290°C pour la MS transfert line et 230°C pour la source

d'ionisation. L'acquisition a été effectuée en mode full scan de 50 à 600 Da avec un scan rate de 20 Hz.

### **1.3. Traitements des données et analyses statistiques**

Pour la GC-MS les fichiers bruts ont été obtenus et converti au format « .CDF » sous Xcalibur. Les données ont été analysées sous le logiciel W4M [243] en utilisant le package metaMS [257], xcms [238] et camera [245] qui permettent d'extraire les pics, de les aligner, de corriger la dérive analytique et d'annoter les pics.

Pour les données issues de la LC-MS et de la GC-MS, une matrice de données contenant l'intensité, la masse ( $m/z$ ) et les temps de rétention des pics a été constituée. Une transformation logarithmique a été faite pour rapprocher les données asymétriques de la normalité. Une panoplie de tests statistiques est ensuite effectuée sur les données issues de l'analyse métabolomique ciblée en GC-MS et en LC-MS. Des analyses de type ACP, PLS-DA et Biosigner [258] qui est un package qui permet d'évaluer la pertinence de prédiction pour trouver le plus petit sous-ensemble de caractéristiques qui contribue de façon significative à la performance du modèle ont été utilisés. L'approche de Biosigner est exécutée en parallèle avec les classificateurs binaires PLS-DA, Random Forest et Support Vector Machines (SVM). Cet outil est disponible sous la plateforme W4M. Un ANOVA pour comparer les 3 groupes d'échantillons a aussi été effectué (Thevenot EA, CEA)

# RÉSULTATS

**ARTICLE 1**

**A split-range acquisition method for the non-targeted metabolomic  
profiling of human plasma with hydrophilic interaction chromatography -  
high-resolution mass spectrometry**

Fanta Fall, Natacha Lenuzza, Elodie Lamy, Marion Brollo, Emmanuel Naline, Philippe  
Devillier, Etienne Thévenot, Stanislas Grassin-Delye

Accepté - Journal of Chromatography B

La métabolomique non ciblée suscite de plus en plus d'intérêt dans la recherche médicale pour trouver des biomarqueurs de maladies ou pour comprendre le mécanisme d'action des médicaments. Cependant, plusieurs contaminants sont connus pour causer des interférences dans l'analyse LC-MS en fonction des conditions analytiques de laboratoire. Les paramètres d'acquisition optimaux devraient donc à la fois maximiser la détection des composés d'intérêt et minimiser l'influence des contaminants. Dans la littérature, un seul segment de masse est en général utilisé pour analyser les métabolites sur un temps donné. Notre article propose de diviser la gamme de masse d'acquisition en 3 segments pour l'analyse métabolomique. Nous avons testé 5 méthodes d'acquisition de spectrométrie de masse non ciblée différentes afin d'évaluer le rôle des contaminants et de la segmentation de la gamme de masse.

Le plasma humain étant une matrice plus disponible et plus accessible que les macrophages pulmonaires primaires, nous avons choisi de faire notre développement analytique sur cette matrice biologique.

Nos résultats ont montré que l'optimisation des paramètres d'acquisition permettait d'améliorer la détection des métabolites. L'utilisation des gammes de masse (3 segments de masse,  $m/z = 60-300$ ;  $300-600$ ;  $600-900$ ) a induit un gain de sensibilité en comparaison de l'acquisition avec une seule gamme de masse et l'acquisition en évitant les zones contenant les interférences. Ce gain était caractérisé par une augmentation du nombre de pics robustes et fiables détectés et par une amélioration du nombre de pics annotés par les bases de données. La méthode proposée a donc permis une analyse plus complète du métabolome plasmatique humain qui peut être appliquée aux études physiopathologiques.



# A split-range acquisition method for the non-targeted metabolomic profiling of human plasma with hydrophilic interaction chromatography - high-resolution mass spectrometry



Fanta Fall<sup>a</sup>, Natacha Lenuzza<sup>b</sup>, Elodie Lamy<sup>a</sup>, Marion Broлло<sup>c</sup>, Emmanuel Naline<sup>c,d</sup>, Philippe Devillier<sup>c,d</sup>, Etienne Thévenot<sup>b</sup>, Stanislas Grassin-Delyle<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM U1173, Plateforme de Spectrométrie de Masse, UFR Simone Veil - Santé, Université Versailles – Saint Quentin en Yvelines, Université Paris Saclay, Montigny le Bretonneux, France

<sup>b</sup> CEA, LIST, Laboratory for Data Sciences and Decision, MetaboHUB-Paris, Gif-sur-Yvette, France

<sup>c</sup> UPRES EA220, Université Versailles – Saint Quentin en Yvelines, Université Paris Saclay, Suresnes, France

<sup>d</sup> Département des Maladies des Voies Respiratoires, Hôpital Foch, Suresnes, France

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Metabolomics  
High-resolution mass spectrometry  
Hydrophilic interaction liquid chromatography  
Human plasma

## ABSTRACT

Untargeted metabolomics of human plasma with mass spectrometry is of particular interest in medical research to explore pathophysiology, find disease biomarkers or for the understanding of the response to pharmacotherapy. Since analytical performances may be impacted by the laboratory environment and the acquisition method settings, the objectives of this study were to assess the role of interfering compounds and to propose an acquisition method to maximize the metabolome coverage for human plasma metabolomic analysis.

Human plasma samples were processed with liquid/liquid extraction then analysed with HILIC-high resolution mass spectrometry. A method with a single  $m/z$  range was compared to four methods with different split acquisition ranges and four sets of ionization source parameters were compared. The data were analysed with the R software and on the Worklow4Metabolomics online platform.

The major interfering compounds were identified in blank samples where they accounted for up to 86% of the signal intensity. Splitting the acquisition range into 3  $m/z$  ranges improved the number of detected features, the number of features with proposed annotation in the Human Metabolome Database, as well as signal intensity throughout the whole  $m/z$  range. The method performing best was the one using three  $m/z$  ranges of approximately the same extent. Ionization source parameters also strongly affected the number of detected features.

Splitting the acquisition range into 3  $m/z$  ranges with optimized ionization source parameters allows a comprehensive analysis of the human plasma metabolome with perspectives for applications to pathophysiological studies.

## 1. Introduction

Metabolomics is a phenotyping approach interested in molecules located downstream (in biological terms) of those targeted by established genomics, transcriptomics and proteomics approaches. It provides novel insights into mechanisms of disease pathogenesis and is useful for the discovery of biomarkers for disease diagnosis, prognosis or for the prediction of the response to pharmacotherapy in the era of precision medicine [1,2]. As for the above-mentioned classical “omics” technologies, untargeted approaches are best suited for the discovery of biomarkers and mass spectrometry (MS) has become the most

convenient analytical platform for the sensitive and comprehensive metabolomic profiling of human tissues and fluids, especially with the expansion of high-resolution instruments. Plasma is the biofluid of choice for human studies, it is easy to collect and reflects the systemic metabolism. It contains thousands of metabolites of varying abundance, molecular weight, polarity, water solubility and ionization states which may each require specific analytical conditions to be detected. Therefore, the interest of combining hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and reverse-phase (RP) liquid chromatography to improve the coverage of plasma metabolome has already been reported [3–6]. Although the aim of the analysis is to focus only on molecules

\* Corresponding author at: INSERM UMR 1173, Plateforme de Spectrométrie de Masse MasSpecLab, UFR Simone Veil - Santé, 2 avenue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux, France.

E-mail address: [stanislas.grassin-delyle@uvsq.fr](mailto:stanislas.grassin-delyle@uvsq.fr) (S. Grassin-Delyle).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121780>

Received 24 May 2019; Received in revised form 7 August 2019; Accepted 27 August 2019

Available online 28 August 2019

1570-0232/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

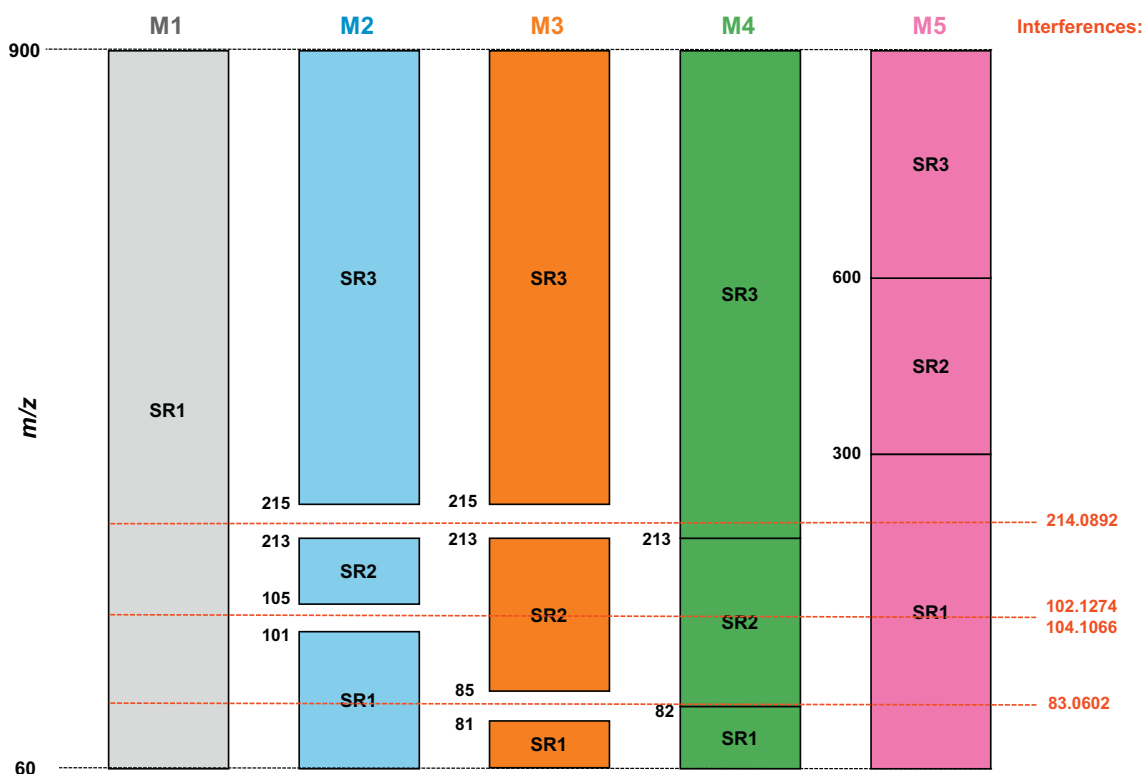


Fig. 1. Schematic overview of the different acquisition methods.  $m/z$  splitting ranges are depicted for each method. SR = scan range.

present in the plasma sample, the performance of untargeted analysis may also be impacted by interfering compounds from the laboratory environment, i.e. in the materials, reagents or in the analytical instruments as a residue from previous analytical runs. Well-described interferences are proteins, solvents, polymers, plastics and additives such as detergents or ion pairing reagents, which are known to affect MS analysis [7]. Optimal acquisition parameters should therefore both maximize the detection of compounds of interest and minimize the influence of contaminants. However, despite the widespread use of metabolomic analysis, the influence of exogenous contaminants and the optimisation of mass spectrometry parameters for the metabolomic analysis of human plasma has never been investigated to date. The objectives of the present study were first to assess the main interfering compounds in a laboratory setting then to propose an analytical strategy to maximize the number of compounds detected in human plasma. HILIC was retained for chromatography since it was described to have the widest serum metabolome coverage [3].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

LC-MS-grade ammonium formate and formic acid (98%) were supplied by Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). LC-MS-grade methanol, acetonitrile, chloroform and water were from Fisher Scientific (Illkirch, France). Deuterated internal standards (IS) were from Bertin technologies (Montigny le Bretonneux, France) (anandamide- $d_4$ , 25-hydroxycholesterol- $d_6$ , 2-arachidonoylglycerol- $d_8$ ) and LCG standards (St. Louis, MO, USA) (hydrocortisone- $d_4$ , glyburide- $d_3$ , fludrocortisone- $d_2$ , testosterone- $d_3$ , propoxyphene- $d_5$ , chlorpromazine- $d_3$  and fluoxetine- $d_6$ ). Plasma was obtained from the local blood bank (Etablissement Français du Sang, Rungis, France).

### 2.2. Sample preparation

One hundred microliters of plasma were spiked with 10  $\mu\text{L}$  of the mix of deuterated internal standards (anandamide- $d_4$ , 25-hydroxycholesterol- $d_6$ , 2-arachidonoylglycerol- $d_8$ , hydrocortisone- $d_4$  and glyburide- $d_3$ , 0.5  $\text{mg L}^{-1}$  and fludrocortisone- $d_2$ , testosterone- $d_3$ , propoxyphene- $d_5$ , chlorpromazine- $d_3$  and fluoxetine- $d_6$ , 0.05  $\text{mg L}^{-1}$ ) then subjected to liquid/liquid extraction using 1 mL of methanol/chloroform/water (1:2:1 v/v/v) [8]. The mixture was vortexed for 30 s, agitated for 20 mins and centrifuged at 10000 rpm for 5 mins. 200  $\mu\text{L}$  of upper phase were collected and dried under vacuum. The dried extracts were reconstituted with 75  $\mu\text{L}$  of ammonium formate/acetonitrile (20:80 v/v) and transferred into injection vials for analysis. Plasma samples from 3 different healthy donors were analysed in triplicate in each experimental condition together with blank samples consisting in mobile phase only. Samples were injected in random order.

### 2.3. Chromatographic separation

Chromatography was performed with an UltiMate 3000 system (Thermo Scientific Dionex, Les Ulis, France). A SeQuant® 4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$  i.d. ZIC-pHILIC column (AIT France, Houilles, France) was used for chromatography [9]. Separation was performed under gradient elution using a mobile phase system consisting of ammonium formate 10 mM pH 3.8 (solvent A) and acetonitrile (solvent B). Starting conditions were 95% solvent B for 3 min then reaching 8% at 25 min. This plateau was kept for 5 more minutes, then back to 95% and equilibration for 10 min. Flow rate was 0.3  $\text{mL min}^{-1}$  and oven temperature 40  $^\circ\text{C}$ .

### 2.4. High-resolution mass spectrometry analysis

Compounds were detected with a Q-Exactive mass spectrometer (ThermoFisher) equipped with a heated electrospray ionization (HESI) source. Nitrogen (N2-45 nitrogen generator, VWR International,

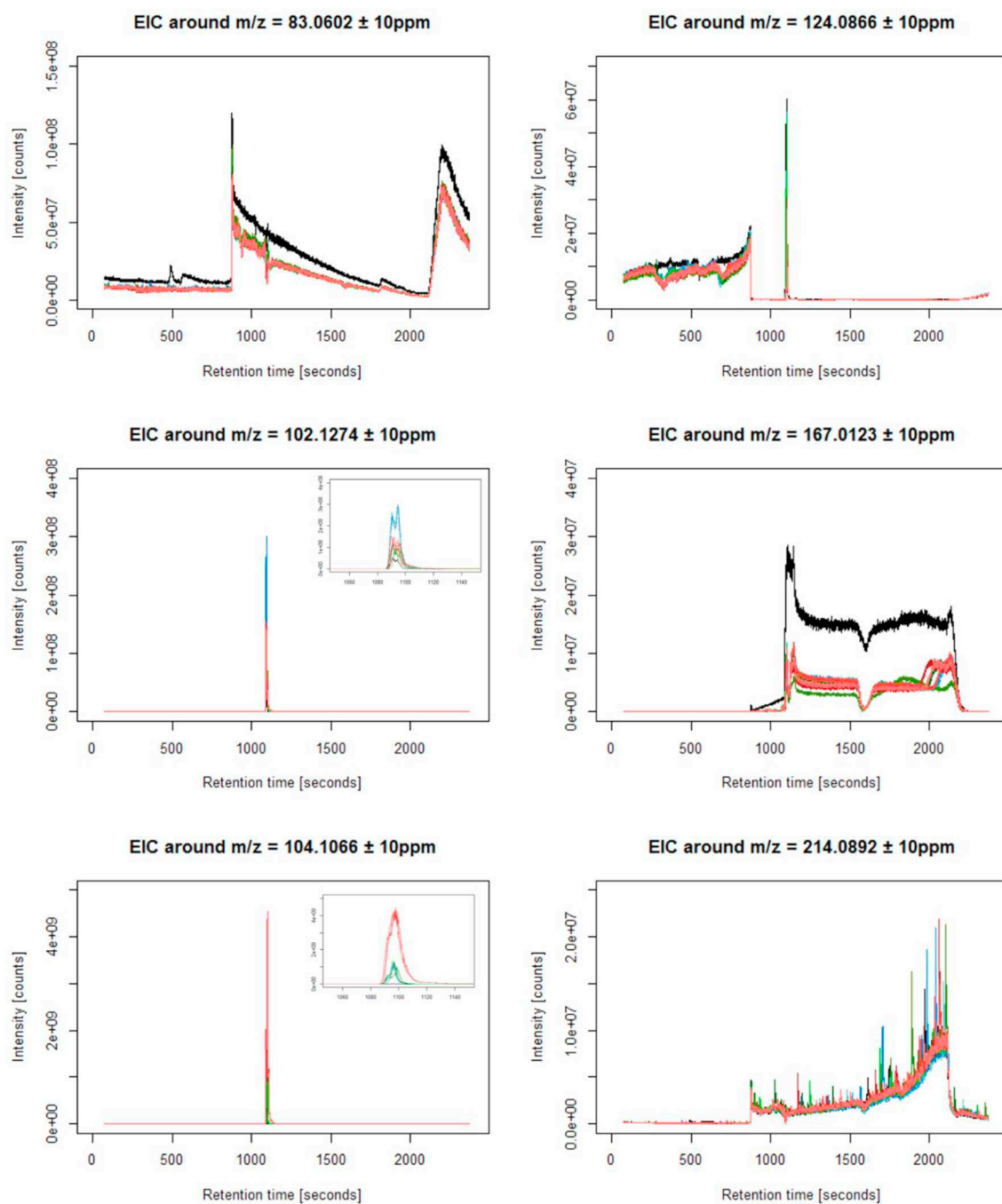


Fig. 2. Extracted ion chromatograms of interfering compounds. Each colour corresponds to a plasma sample from a different donor. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fontenay sous bois, France) was employed as sheath and auxiliary gas.

#### 2.4.1. Source parameters

The HESI source was set in the positive ionization mode with a capillary temperature of 275 °C. Unless otherwise stated, sheath and auxiliary gas flow rate were set at 40 and 25 arbitrary units, respectively; S-lens RF level at 100, spray voltage at 4000 V and temperature of vaporization at 100 °C.

#### 2.4.2. Acquisition parameters

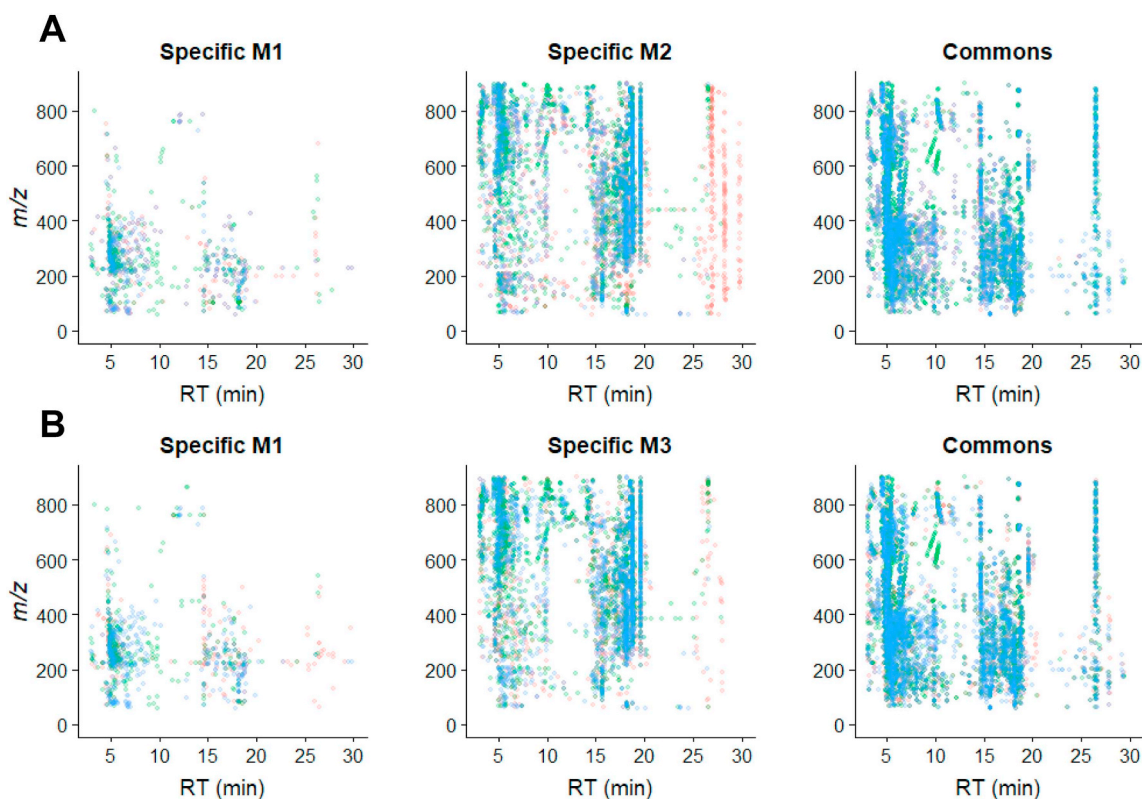
In the first part of the study, samples were analysed using a single full-scan  $m/z$  range (60–900) to identify the main analytical interferences. Then, four other acquisition methods were evaluated to assess

the influence of splitting the scan range at masses of the main interfering compounds. Comparison was performed between the full-scan method ( $m/z$  60–900, method M1) and different split methods (Fig. 1): method M2 (3  $m/z$  ranges,  $m/z$  60–101; 105–213; 215–900), method M3 (3  $m/z$  ranges,  $m/z$  60–81; 85–213; 215–900), method M4 (3  $m/z$  ranges,  $m/z$  60–82; 82–213; 213–900) and method M5 (3  $m/z$  ranges,  $m/z$  60–300; 300–600; 600–900). Resolution was set at 70000, AGC target at  $10^6$  and maximum IT at 256 ms. Data acquisition was performed using Chromeleon v 6.80 and Xcalibur v3.0.63 (ThermoFisher).

#### 2.5. Data analysis

XCalibur RAW files were first converted to mzML and centroidized





**Fig. 3.** Comparison of features between the M1 and M2 (A) and M1 and M3 (B) acquisition methods.  $m/z$  and retention time are represented for each feature (after retention time and signal filtering), for features specific to each method and features common to both methods. The green, blue and red dots represent the 3 plasma samples which were analysed in triplicates. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 1**

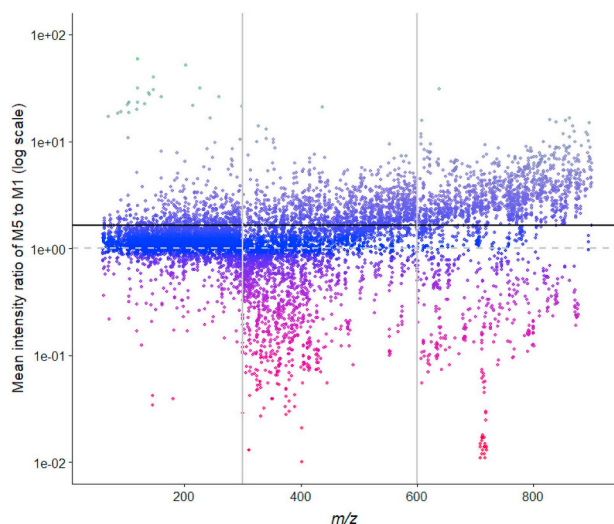
Number of peaks in each method before and after filtering.

Method	Total peaks in blank sample (n)	Total peaks in study samples (mean [min–max])	Robust peaks (mean [min–max])	RT-filtered robust peaks (mean [min–max])	Robust, relevant peaks (signal- and RT-filtered robust peaks) (mean [min–max])	PPS
M1	1879	5366 [5060–5669]	4689 [4528–4982]	3970 [3758–4292]	2892 [2615–3315]	3283
M2	6876	15,304 [14,557–15,762]	12,858 [11,832–13,751]	10,612 [9745–11,362]	8340 [7472–9128]	6707
M3	6960	14,848 [13,932–15,445]	12,515 [11,620–13,132]	10,357 [9535–10,920]	8203 [7443–8827]	6874
M4	7983	14,721 [14,130–15,197]	12,473 [11,531–12,963]	10,287 [9386–10,769]	8272 [7387–8851]	6847
M5	9068	18,697 [17,695–19,296]	16,076 [15,098–15,592]	12,874 [11,933–13,377]	11,005 [10,146–11,542]	8162

RT: retention time; PPS: peak picking score (the highest the better).

with msConvert [10], then processed using IPO [11] and XCMS (v1.50.1) [12] packages running under R. The CentWave algorithm [13] was used for automatic peak picking: ppm = 10, snthresh = 10, peakwidth = 15–70, mzdifff = 0.01 and prefilter = c(3, 5000), with the peakwidth parameter optimized with IPO. Alignment step was performed using the group.density method (bw = 5, mzwid = 0.01, minfrac = 0.5) and retcor.loess method (missing = n\_blank + 1, extra = 1). The peak table obtained at this step therefore contained the total number of peaks in study samples. Then, several filters were applied to exclude non-relevant peaks (based on analytical criteria) detected by XCMS [14] (Supplementary Fig. 1): first, robust peaks were defined as peaks found in  $\geq 2$  of the samples of at least one condition; then all features with a retention time outside the window 3–30 min were discarded (retention time filter) and features detected in biological samples with a mean intensity < 2-fold the intensity observed in blank

samples, or features detected in blank samples only were also filtered out (signal filter). This group therefore constitutes the “robust, relevant peaks” group. The peak picking score (PPS) obtained with the IPO algorithm was used to assess the quality of the peak list obtained which each method. PPS was defined as the ratio of reliable peaks (RP) (which are peaks part of an isotopologue consisting of  $^{13}\text{C}$  isotope peaks) weighted by the exponential factor 2, to the total number of peaks ( $(\text{number of reliable peaks})^2 / (\text{total number of peaks})$ ). Therefore, if the RP value and the total number of relevant peaks increase by the same amount, the PPS increases. All these filtering steps and peak definitions are shown in Supplementary Fig. 1.



**Fig. 4.** Intensity ratio for features common to the M5 and M1 methods. The M5/M1 ratio (log scale) are shown as a function of  $m/z$ . The horizontal dashed gray line represents the identity line, the horizontal black line represents the mean, vertical gray lines represent the  $m/z$  ranges of the M5 method.

**Table 2**  
Sets of parameters of the ionization source.

Parameter	Low	Medium	Intermediate	High
S-lens RF level	50	75	100	100
Spray voltage	1500	3000	4000	5000
Sheath gas flow rate	10	35	40	60
Aux gas flow rate	5	15	25	30
Temperature of vaporization	100	200	100	300

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Evaluation of interferences

Interferences originating from the laboratory environment and unrelated to plasma samples were assessed by the examination of ions present in blank samples (Fig. 2). Three profiles were found for the most abundant interfering ions: intermittent interferences occurring at a specific retention time ( $m/z$  102.1274 and 104.1066); interferences present during a significant part of the run ( $m/z$  167.0123 and 214.0892) and interferences present during the whole run ( $m/z$  83.0602). The signal intensity for those interfering compounds was between  $10^7$  and  $4.10^9$ , which accounted up to a maximum of 85.7% of the total signal. The major interferences were identified as being acetonitrile ( $m/z$  83.0602), triethylamine ( $m/z$  102.1274) and *n*-butyl benzenesulfonamide ( $m/z$  214.0892). Acetonitrile originates from mobile phase, triethylamine was previously used on the same instrument and is well-described to have a persistent memory effect in LC-MS [15], and *n*-butyl benzenesulfonamide is a widespread plasticizer [7]. Considering the signal intensity observed for these molecules, the C-trap should be filled faster with interferences, which in turn should decrease

**Table 3**  
Effect of ionization source parameters on peak detection.

Method	Total peaks in blank sample (n)	Total peaks in study samples (n)	Robust peaks (n)	RT-filtered robust peaks (n)	Robust, relevant peaks (signal- and RT-filtered robust peaks) (n)	PPS
Low	2938	7211	5836	5199	3220	2629
Medium	11,807	20,259	12,755	9184	5272	3576
Intermediate	7010	16,889	13,625	10,314	6588	4153
High	8376	19,187	14,510	11,026	5895	2678

RT: retention time; PPS: peak picking score (the highest the better).

the sensitivity for compounds of interest. Therefore, the effect of splitting the acquisition  $m/z$  range was examined to avoid the acquisition of the main interfering compounds and possibly enhance the detection of metabolites.

#### 3.2. Effect of excluding interfering compounds from acquisition

The  $m/z$  of the most intense intermittent interferences ( $m/z$  102.1274 and 104.1066) as well as from *n*-butyl benzenesulfonamide ( $m/z$  214.0892) were first excluded from the acquisition method (Fig. 1; M2 acquisition method). The comparison of the triplicate analysis of plasma samples with the original M1 method and this modified M2 method resulted in the increase of the mean total number of peaks from 5366 to 15,304 peaks, with a corresponding increase of robust, relevant peaks from 2892 to 8340 peaks (Table 1). 368 peaks were specific of the M1 method; 2210 of the M2 method while 3086 were common to both methods (Supplementary Table 1). The peaks specific to the M2 method were equally distributed over all the  $m/z$  range and mostly detected in the first 10 min or between 15 and 20 min of the analytical run (Fig. 3A).

Then, the  $m/z$  ranges of the interference detected during the whole run (acetonitrile,  $m/z$  83.0602) as well as from *n*-butyl benzenesulfonamide ( $m/z$  214.0892) were excluded (Fig. 1, method M3). For this M3 method, the total number of peaks was 14,848, corresponding to 8203 robust, relevant peaks. 2019 peaks were specific of the M3 method (compared to M1; Supplementary Table 1). As for method M2, these peaks were equally distributed over the  $m/z$  range and mostly detected in the first 10 min or between 15 and 20 min of the analytical run (Fig. 3B). Altogether, these results suggest that excluding interfering  $m/z$  from the acquisition allows a better detection of the sample compounds all over the  $m/z$ - and time- ranges.

#### 3.3. Effect of $m/z$ range splitting

Since splitting the  $m/z$  range systematically increased the number of peaks detected, we addressed whether this observation was due to the exclusion of interferences or if it was the consequence of splitting the acquisition method into several  $m/z$  ranges. The method M2 was therefore compared to method M4 where the acquisition range was split into three continuous ranges, without any gap between each range (Fig. 1). As shown in Table 1, both methods allowed the detection of an equivalent number of total and robust, relevant peaks and 5441 features were common to both methods (Supplementary Table 1). This suggests that splitting the scan range is more useful for increasing the number of detected compounds than excluding specific interferences.

#### 3.4. Effect of $m/z$ range size

Finally, in order to fully assess the impact of  $m/z$  range splitting, a new M5 method was designed, where the  $m/z$  interval of each of the 3 split ranges was between 240 and 300 units (Fig. 1). Optimizing the size of  $m/z$  ranges increased the number of robust, relevant peaks from 8272 to 11,005 (33% increase in comparison to the M4 method), as shown in Table 1. 4781 peaks were common to both methods whereas 1764 peaks were specific of the M5 method. The gain in the number of peaks

detected is mainly in the  $m/z$  range from 300 to 900 (Supplementary Table 1 and Supplementary Fig. 2). With this latest M5 method, the PPS score was the highest obtained among the 5 methods. The mass spectrometric fundamentals explaining this phenomenon for Q-Exactive instruments are related to the value of the voltage applied to the focusing lenses (RF) of the C-trap. This voltage is automatically adapted to the smallest mass value of the scan by the instrument and cannot be modified. For example, for a scan of 60 to 900  $m/z$  it is set to allow optimal extraction of small mass ions, and therefore the extraction of high mass ions will not be optimal. By dividing the same mass range into 3 segments (60–300, 300–600 and 600–900  $m/z$ ), and thus into 3 consecutive scans, an RF value is applied for each segment and depends on the smallest mass in the segment. A first value is therefore optimized for masses close to 60, a second for masses close to 300 and a third for masses close to 600. In addition, for scans from 300 to 600 and from 600 to 900  $m/z$ , the quadrupole filters all masses below 300 and 600 and therefore decreases the background noise generated by the mobile phase (or other contaminants), which allows the detection of more peaks of interest. Thus, the performance of using several consecutive scans on complementary mass ranges for methods intended to cover large mass ranges is better, because the value of the RF applied to the C-trap will be optimized for each scan and will allow a better extraction of the ions from each scan.

Splitting into 2 or 3  $m/z$  ranges was also compared. With a method consisting in 2  $m/z$  ranges (60–200 and 200–900), the number of relevant, robust peaks was 5854, which is about 3-fold lower than with the 3-scan range method.

### 3.5. Consequences on metabolite annotation

Although detecting a higher number of robust, reliable peaks demonstrates increased sensitivity, understanding pathophysiological mechanisms with metabolomic analysis makes it mandatory to annotate (i.e. identify) the compounds of interest. Therefore, the number of annotated compounds after HMDB database query was compared between the initial M1 and the final M5 methods. For the M1 method, compound identification was proposed for 1633 of the relevant, robust peaks, raising to 4397 for the M5 method i.e. a 169% increase in the number of peaks with proposed annotation.

### 3.6. Consequences on signal intensity for metabolites or deuterated standards

Finally, although splitting the  $m/z$  range obviously increases the number of detected features, the impact of splitting on the signal intensity of known and unknown compounds was assessed. For deuterated internal standards, mean peak area of triplicate analysis of 3 plasma samples with the M5 method was  $126 \pm 52\%$  [49–275] of the mean peak area observed with the M1 method. When comparing the signal intensity of features detected with the initial M1 and final M5 method, a mean 1.6-fold increase in intensity was observed, with 25th and 75th percentiles at 0.95 and 1.85, respectively (Fig. 4). This increase occurred for all 3  $m/z$  ranges and was even greater for the highest  $m/z$ , whereas splitting into 2  $m/z$  ranges may induce a loss of signal in the low  $m/z$  range [16].

### 3.7. Ionization source parameters

The parameters of the ESI strongly influence the number of detected features, as shown with the metabolomic analysis of plant samples [17], and should therefore be optimized for each experimental setting. To assess whether compound detection could be further improved in human plasma with optimizing ionization source parameters, four sets of parameters were compared with low, medium, high or intermediate values for S-Lens RF level, spray voltage, sheath and auxiliary gas flow rate and temperature of vaporization (Table 2). Results are shown in

**Table 3.** The intermediate set of parameters provided the highest number of robust, relevant peaks and highest PPS score.

## 4. Conclusions

Scientists employing high-resolution instruments for untargeted mass spectrometry analysis, such as metabolomic studies, face new challenges with respect to the simultaneous recording of a huge number of features in a given  $m/z$  range, which may be either background noise or compounds of interest. Metabolites are considered to be molecules with a molecular weight < 1000 Da, which implies to cover a mass range between about 50 and 1000 Da to ensure the widest coverage. In the vast majority of methods described to date, a single acquisition range as well as generic ionization source parameters was used. Although a strategy for splitting the acquisition range into a low and high  $m/z$  ranges was previously investigated for the analysis of renal cell metabolome with reverse-phase chromatography [16], no investigation with an interference-driven splitting strategy was reported to date for the analysis of human plasma. The results of the present study show the interest of splitting the  $m/z$  acquisition range into 3 segments for the metabolomic analysis of human plasma with hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. Since acquisition range splitting outperforms excluding the acquisition of the main interferences, such strategy may be universally applied, regardless of the contaminants that may be present in each laboratory environment. The performance gain affects both the number of compounds detected and also the number of molecules for which an annotation can be proposed by querying the databases, which is the final goal of the metabolomic analysis. In addition, sensitivity was also improved throughout the entire  $m/z$  range whereas different splitting strategies may induce a loss of signal [16]. In combination with the optimization of the ionization source parameters, the proposed method therefore allows a more comprehensive analysis of the human plasma metabolome which may be applied to pathophysiological studies.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121780>.

## Funding sources

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (PhD grant, Fanta Fall).

## Declaration of competing interest

The authors have nothing to declare.

## References

- [1] P. Devillier, H. Salvator, E. Naline, L.J. Couderc, S. Grassin-Delyle, *Metabolomics in the diagnosis and pharmacotherapy of lung diseases*, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 2050–2059.
- [2] L. Guo, M.V. Milburn, J.A. Ryals, S.C. Lonergan, M.W. Mitchell, J.E. Wulff, D.C. Alexander, A.M. Evans, B. Bridgewater, L. Miller, M.L. Gonzalez-Garay, C.T. Caskey, *Plasma metabolomic profiles enhance precision medicine for volunteers of normal health*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E4901–E4910.
- [3] S. Boudah, M.F. Olivier, S. Aros-Calt, L. Oliveira, F. Fenaille, J.C. Tabet, C. Junot, *Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry*, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 966 (2014) 34–47.
- [4] K. Contrepois, L. Jiang, M. Snyder, *Optimized analytical procedures for the untargeted metabolomic profiling of human urine and plasma by combining hydrophilic interaction (HILIC) and reverse-phase liquid chromatography (RPLC)-mass spectrometry*, *Mol. Cell. Proteomics* 14 (2015) 1684–1695.
- [5] D.Q. Tang, L. Zou, X.X. Yin, C.N. Ong, *HILIC-MS for metabolomics: an attractive and complementary approach to RPLC-MS*, *Mass Spectrom. Rev.* 35 (2016) 574–600.
- [6] C. Virgiliou, H.G. Gika, G.A. Theodoridis, *HILIC-MS/MS multi-targeted method for metabolomics applications*, *Methods Mol. Biol.* 1738 (2018) 65–81.
- [7] B.O. Keller, J. Sui, A.B. Young, R.M. Whittall, *Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry*, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 71–81.

- [8] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
- [9] R. Zhang, D.G. Watson, L. Wang, G.D. Westrop, G.H. Coombs, T. Zhang, Evaluation of mobile phase characteristics on three zwitterionic columns in hydrophilic interaction liquid chromatography mode for liquid chromatography-high resolution mass spectrometry based untargeted metabolite profiling of *Leishmania* parasites, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 168–179.
- [10] D. Kessner, M. Chambers, R. Burke, D. Agus, P. Mallick, ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development, *Bioinformatics* 24 (2008) 2534–2536.
- [11] G. Libiseller, M. Dvorzak, U. Kleb, E. Gander, T. Eisenberg, F. Madeo, S. Neumann, G. Trausinger, F. Sinner, T. Pieber, C. Magnes, IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters, *BMC Bioinf.* 16 (2015) 118.
- [12] C.A. Smith, E.J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, G. Siuzdak, XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification, *Anal. Chem.* 78 (2006) 779–787.
- [13] R. Tautenhahn, C. Bottcher, S. Neumann, Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS, *BMC Bioinf.* 9 (2008) 504.
- [14] O.D. Myers, S.J. Sumner, S. Li, S. Barnes, X. Du, One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: new algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks, *Anal. Chem.* 89 (2017) 8696–8703.
- [15] H. Rutters, T. Mohring, J. Rullkotter, J. Griep-Raming, J.O. Metzger, The persistent memory effect of triethylamine in the analysis of phospholipids by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 122–123.
- [16] C. Ranninger, L.E. Schmidt, M. Rurik, A. Limonciel, P. Jennings, O. Kohlbacher, C.G. Huber, Improving global feature detectabilities through scan range splitting for untargeted metabolomics by high-performance liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 930 (2016) 13–22.
- [17] F. Tugizimana, P.A. Steenkamp, L.A. Pieter, I.A. Dubery, Mass spectrometry in untargeted liquid chromatography/mass spectrometry metabolomics: electrospray ionisation parameters and global coverage of the metabolome, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32 (2018) 121–132.

**Supplementary Table 1:** Number of specific and common features for each method in the three plasma samples

		Plasma 1					Plasma 2					Plasma 3					Mean					
		Specific					Specific					Specific					Specific					
		Method	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
<b>versus</b>	<b>M1</b>			1,768	1,911	1,540	3,405		2,083	2,085	2,163	3,859		2,778	2,061	2,099	3,622		2,210	2,019	1,934	3,629
	<b>M2</b>	345		157	179	1763	351		94	135	1,877	408		286	141	1,736	368		179	152	1,792	
	<b>M3</b>	332	122		58	1707	349	98		61	1,902	381	440		53	1,710	354	220		57	1,773	
	<b>M4</b>	346	165	58		1716	337	119	37		1,915	382	247	68		1662	355	177	54		1,764	
	<b>M5</b>	258	766	820	689		275	898	841	905		324	1,108	831	851		286	924	831	815		
		Common					Common					Common					Common					
		Method	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
<b>and</b>	<b>M2</b>	2,759					3,192					3,308					3,086					
	<b>M3</b>	2,875	5,024				3,178	6,053				3,538	6,024				3,197	5,700				
	<b>M4</b>	2,724	4,557	4,986			3,153	5,759	5,872			3,274	6,007	5,982			3,050	5,441	5,613			
	<b>M5</b>	3,035	4,236	4,504	4,96		3,260	5,054	5,119	5,054		3,441	5,463	5,194	5,093		3,245	4,918	4,939	4,781		

Each plasma sample was analysed in triplicate. Specific means that a feature was found in the 3 replicates of one sample and in none of the other.

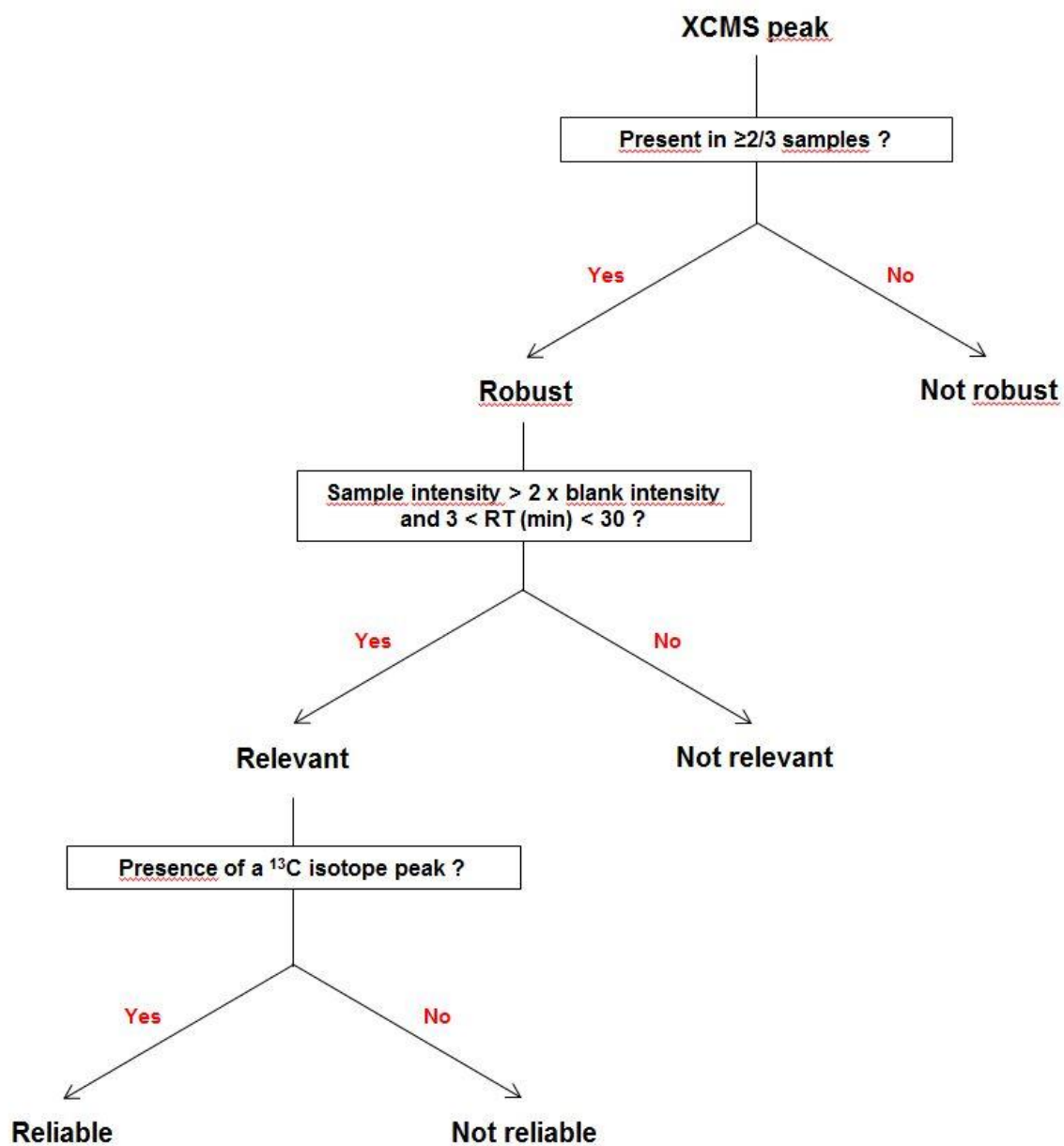
## LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURES

### **Supplementary Figure 1: Filtering strategy and nomenclature**

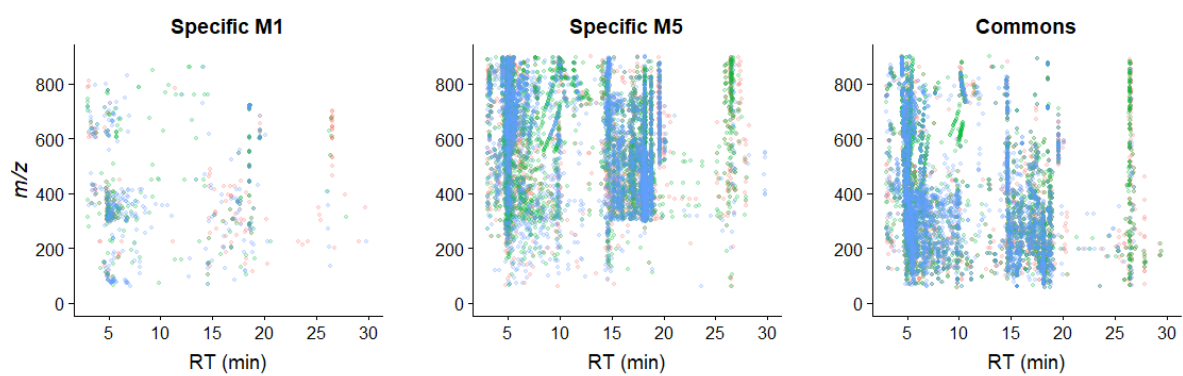
### **Supplementary Figure 2: Comparison of features between the M1 and M5 acquisition**

**methods.**  $m/z$  and retention time are represented for each feature (after retention time and signal filtering), for features specific to each method and features common to both methods. The green, blue and red dots represent the 3 plasma samples which were analysed in triplicates.

Supplementary figure 1



## Supplementary figure 2





## RESULTATS COMPLÉMENTAIRES ARTICLE 1

### **Explication instrumental de l'amélioration de la détection.**

La valeur de la RF (V), tension appliquée aux bornes des lentilles de focalisation, appliquée à la C-trap est automatique et dépend du scan choisi. Elle est adaptée à la plus petite valeur de masse du scan. Par exemple, pour un scan de 60 à 900 m/z elle est réglée pour permettre l'extraction optimale des ions de petite masse. Donc l'extraction des ions de haute masse ne sera pas optimale. Il est donc préférable si on veut analyser des masses de 60 à 900 m/z de séparer les scans. En séparant en 3 groupes de masse (60-300, 300-600 et 600-900 m/z) une valeur de RF est appliquée pour chaque groupe et dépend de la plus petite masse du groupe. Une valeur est donc optimisée pour les masses proches de 60, une seconde pour les masses proches de 300 et une troisième pour les masses proches de 600. De plus, pour les scans de 300 à 600 et de 600 à 900 m/z le quadripôle filtre toutes les masses inférieures à 300 et donc le bruit de fond généré par la phase mobile, ce qui permet la détection de plus de molécules potentiellement significatives. Cependant, découper en 3 gammes de masse entraîne une détection de moins de scan par gamme de masse (1/3). Dans notre cas cette diminution du nombre de scan par gamme de masse est négligeable face au gain de détection qu'engendrent les variations des RF

Pour conclure, il est conseillé de faire plusieurs scans sur des méthodes couvrant des gammes de masse large, type 60 à 900 m/z, car la valeur de la RF appliquée à la C-trap est optimisée pour chaque scan et permet donc une meilleure extraction des ions de chaque scan. Nous pouvons le vérifier : par exemple sur nos analyses nous voyons que le nombre de pics détectés sur la gamme 600 à 900 m/z est plus importante sur la méthode à 3 scans comparés à la méthode où il n'y a qu'un seul scan de 60 à 900 m/z.

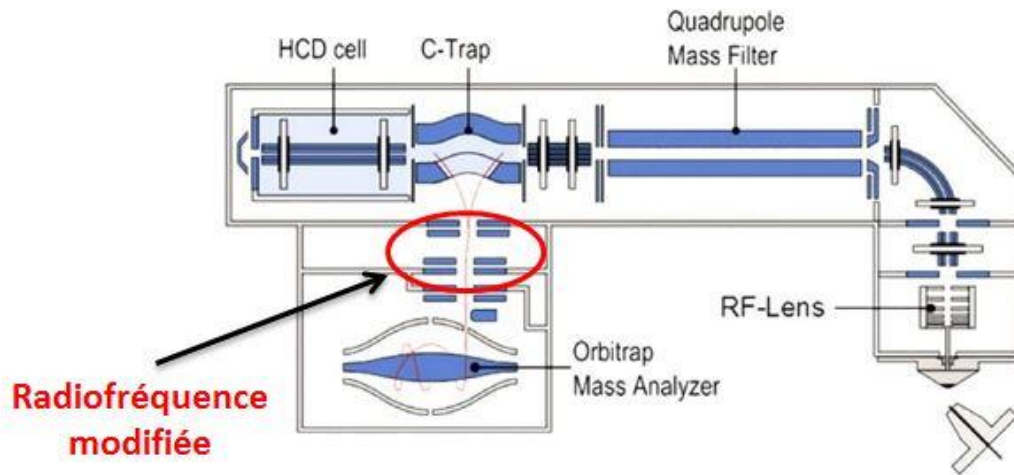


Figure 26 : Q Exactive hybride, spectromètre de masse quadrupole-Orbitrap, RF optimisé automatiquement

**ARTICLE 2**

**Metabolomic changes during the M1- and M2-polarization of human lung  
macrophages**

Fanta Fall, Natacha Lenuzza, Elodie Lamy, Marion Brollo, Emmanuel Naline, Philippe Devillier, Etienne Thévenot, Stanislas Grassin-Delyle

Soumis le xx/xx/xx au Journal xxxxx

Les macrophages pulmonaires sont en première ligne de défense contre les agents pathogènes invasifs, où ils agissent comme effecteurs de la réponse immunitaire et sont les seuls directement exposés à l'environnement extérieur. La différenciation phénotypique des macrophages pulmonaires au phénotype M1 pro-inflammatoire ou au phénotype M2 immunomodulateur induit des schémas spécifiques de production de cytokines et d'expression des protéines membranaires, mais l'activité métabolique du macrophage peut également être affectée. Les macrophages M1 sont obtenus après stimulation par IFN- $\gamma$  ou LPS et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ou IL-12. Les macrophages M2 sont obtenus après stimulation avec IL-13 ou IL-4 et produisent des cytokines immunorégulatrices (IL-10, TGF- $\beta$ ).

Des études menées dans des MDM ou/et des modèles murins montrent que les macrophages M1 sont caractérisés par une régulation à la hausse de l'oxyde nitrique synthase, entraînant le catabolisme de l'arginine en citrulline et en oxyde nitrique, une glycolyse améliorée, avec augmentation des métabolites tels que le succinate, le citrate et le malate, l'activation de la voie du phosphate pentose (PPP) ainsi que celle de la synthèse des acides gras, et une diminution du taux de consommation en oxygène. Dans les macrophages M2, il a été observé une augmentation de la production d'ornithine et de polyamines par la voie de l'arginase, une amélioration de la phosphorylation oxydative ainsi que l'oxydation des acides gras, et une diminution de la glycolyse et due PPP.

L'objectif de ce travail était de caractériser les altérations métaboliques survenant lors de la polarisation expérimentale M1 ou M2 des macrophages pulmonaires humains.

Les résultats ont suggéré que la polarisation M1 avait une influence sur les voies de l'acide arachidonique, des kynurénines et du cycle de Krebs. Une méthode de quantification ciblée de certains métabolites a été développée et les résultats figurent dans l'article 2. Concernant la polarisation M2 les résultats seront présentés dans la section 'résultats complémentaires'.

# **Metabolic reprogramming of LPS-stimulated human lung macrophages involves tryptophan metabolism and the aspartate-arginosuccinate shunt**

Fanta Fall,<sup>1</sup> Elodie Lamy,<sup>1</sup> Marion Brollo,<sup>2</sup> Emmanuel Naline,<sup>2,3</sup> Natacha Lenuzza,<sup>4</sup> Etienne Thévenot,<sup>4</sup> Philippe Devillier,<sup>2,3</sup> Stanislas Grassin-Delyle<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Université Paris-Saclay, UVSQ, INSERM, Infection et inflammation, Montigny le Bretonneux, France

<sup>2</sup> Université Paris-Saclay, UVSQ, Laboratoire Mécanismes moléculaires et pharmacologiques de l'obstruction bronchique, Suresnes, France

<sup>3</sup> Hôpital Foch, Département des maladies des voies respiratoires, Suresnes, France

<sup>4</sup>CEA, LIST, Laboratory for Data Sciences and Decision, MetaboHUB, Gif-sur-Yvette, France

**Corresponding author:** Stanislas Grassin-Delyle, INSERM UMR 1173, UFR Simone Veil - Santé, 2 avenue de la source de la Bièvre, 78180 Montigny le Bretonneux, France. Phone: +33.1.70.42.94.22. E-mail address: stanislas.grassin-delyle@uvsq.fr

## **ABSTRACT**

**Rationale:** Lung macrophages (LM) are in the first line of defense against inhaled pathogens and can undergo phenotypic polarization to the proinflammatory M1 after stimulation with Toll-like receptor agonists. The objective of the present work was to characterize the metabolic alterations occurring during the experimental M1 LM polarization.

**Methods:** Human LM were obtained from resected lungs and cultured for 24 hrs in medium alone or with 10 ng.mL<sup>-1</sup> lipopolysaccharide. Cells and culture supernatants were subjected to extraction for metabolomic analysis with high-resolution LC-MS (HILIC and reverse phase -RP-chromatography in both negative and positive ionization modes) and GC-MS. The data were analyzed with R and the Worklow4Metabolomics and MetaboAnalyst online infrastructures.

**Results:** A total of 8,741 and 4,356 features were detected in the intracellular and extracellular content, respectively, after the filtering steps. Pathway analysis showed involvement of arachidonic acid metabolism, tryptophan metabolism and Krebs cycle in the response of LM to LPS, which was confirmed by the specific quantitation of selected compounds. This refined analysis highlighted a regulation of the kynurenin pathway as well as the serotonin biosynthesis pathway, and an involvement of aspartate-arginosuccinate shunt in the malate production.

**Conclusions:** Macrophages M1 polarization is accompanied by changes in the cell metabolome, with the differential expression of metabolites involved in the promotion and regulation of inflammation and antimicrobial activity. The analysis of this macrophage immunometabolome may be of interest for the understanding of the pathophysiology of lung inflammatory diseases.

**KEYWORDS:** metabolomics; human lung macrophages; tryptophan metabolism; aspartate-arginosuccinate shunt; mass spectrometry

## 1. INTRODUCTION

Lung macrophages are in the first line of defense against inhaled pathogens. They are major effectors of the immune response as they express membrane receptors, including Toll-like receptors (TLRs), able to recognize conserved microbial ligands [1]. Once activated, TLRs induce the production of a pattern of cytokines, chemokines and mediators, such as metabolites from the arachidonic acid pathway, involved in the inflammatory response and characteristics of a macrophage engagement towards a M1 polarization state [1, 2]. Lipopolysaccharide (LPS) is the archetypal TLR ligand for the induction of M1 macrophage polarization [1]. Like allergens (e.g. ragweed pollen, house dust extract, and cat dander) or air pollutants, LPS binds to and activates TLR4, the first subtype among the TLR family to be identified in humans. Beyond this role in cell signaling, TLRs also play a role in the primary function of macrophages, consisting in the phagocytosis and killing of pathogens [3]. For phagocytosis, the production of hydrolytic enzymes and reactive oxygen species (ROS) is required, the latter also resulting from oxidase or lipoxygenase enzyme metabolism [4]. The enzymatic machinery is therefore modulated following the presence of microorganisms, and more generally by the external environment, and consequently the resulting production of metabolites varies, being likely to adapt to the different stimuli to which macrophages can be exposed [5]. Cell metabolism and macrophages functions are tightly linked, as already shown in murine bone-marrow-derived macrophages. Hence, the presence of PGE<sub>2</sub>, one on the main arachidonic acid derivative, is necessary to the LPS-induced production of the precursor of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  [6]; LPS also induces an increased glycolysis and succinate production, necessary to the increase of IL-1 $\beta$  expression and also driving the production of ROS [7, 8]; finally, the TLR4 agonist MPLA induces mouse resistance to systemic infection with *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* by

reprogramming macrophage metabolism, with increased glycolysis and oxidative phosphorylation and rewiring of malate/NADH shuttling [9]. Therefore, the understanding of macrophage metabolic reprogramming has become a key focus in fields such as infection [10], inflammation [11], cancer [12] and immune disorders [13]. With respect to lung pathogenesis, macrophages also play a role in infections and inflammatory diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), where they can undergo a phenotypic differentiation [14-17]. In these cases, TLRs are of prime importance for their role in the recognition of pathogens during infections and in microbe-induced acute exacerbations of asthma and COPD [18, 19]. However, the only reports of macrophage metabolic reprogramming in lung diseases until now were in a mouse model of fibrosis [20], in alveolar macrophages from LPS treated mice [21] and in smoker's or/and *Mycobacterium tuberculosis*-infected alveolar macrophages [22]. Since metabolic changes associated with the stimulation of TLRs in human lung macrophages were not yet described, the objective of the present study was to perform an extensive intra- and extracellular metabolomic characterization of LPS-induced alterations in human lung macrophages using a combined untargeted liquid chromatography high-resolution mass spectrometry and gas chromatography mass spectrometry approach [23].

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Patient population**

The use of resected lung tissue was approved by the regional investigational review board (Comité de Protection des Personnes Ile de France VIII, Boulogne-Billancourt, France) and the patients undergoing surgical lung resection gave their informed consent. Lung tissue was obtained from 10 patients with the following demographic characteristics: (median [25<sup>th</sup>-75<sup>th</sup> percentiles]) age: 67.5 years [56.75-75.5]; 7 males, 3 females; body mass index: 24 kg/m<sup>2</sup> [18.75-26.25]; current tobacco smokers/ex-tobacco smokers/pipe smoker: 4/6/1; pack-years: 30 [15-80]; and % FEV1 predicted: 109% [81-121]. One patient was suffering from COPD (as defined by a post-bronchodilator FEV1/FVC ratio <0.7; GOLD 2 stage) and none had undergone chemotherapy or radiotherapy prior to surgical lung resection.

### **2.2. Reagents**

Penicillin, streptomycin, L-glutamine, LPS from *Escherichia coli* (serotype K12), fatty acid methyl esters (FAMES), LC-MS-grade ammonium formate and formic acid (98%) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). RPMI 1640 medium, phosphate-buffered saline, and fetal calf serum (FCS) were obtained from Eurobio Biotechnology (Les Ulis, France). LC-MS-grade methanol, acetonitrile, chloroform, isopropanol and water were from Fisher Scientific (Illkirch, France). All cell culture plastics were purchased from CML (Nemours, France).

### **2.3. Cell culture**



Human lung macrophages were isolated and cultured as previously described [1]. 2 million cells were cultured for 24 hrs in medium alone or with 10 ng.mL<sup>-1</sup> LPS. Supernatants were collected and centrifuged at 2000 rpm for 5 min at 4°C, then frozen at -80°C. Adherent macrophages were washed twice with sterile cold PBS. For LC-MS analysis, the macrophages were collected with 500 µL of methanol/water (1:1); for GC-MS analysis 1 mL of acetonitrile/isopropanol/water (3:3:2) was used. The plates were left at -80°C for 20 min then scraped with a pipette tip to recover the cells and samples were kept at -80°C until analysis.

## **2.4. Metabolomic analysis**

### **2.4.1. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry**

Sample preparation was adapted from the method described by Bligh and Dyer [24]. For supernatants, 500 µL of methanol/water (1:1) were added to 100 µL of culture medium. Then, for both supernatants and cells, 500 µL of chloroform were added. The mixture was sonicated for 10 min, stir for 10 min and centrifuged at 10000 rpm for 5 mins to achieve a biphasic separation with the upper phase containing polar compounds and the lower fraction nonpolar compounds. 2x200 µL of each phase were collected in Eppendorf tubes and dried under vacuum. One of each 4 dried extracts was reconstituted with 75 µL of each of the following mixtures: formate/acetonitrile (20:80 v/v) and carbonate/acetonitrile (20:80 v/v) for extracts from the upper phase subsequently analysed with hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC); formate/acetonitrile (80:20 v/v) and carbonate/acetonitrile (80:20 v/v) for extracts from the lower phase subsequently analysed with reverse phase (RP) chromatography. Quality control samples were prepared by pooling 5 µL of each extracted sample.

LC-HRMS analysis was adapted from a previously described method [23] and each sample was injected four times, with HILIC and RP chromatography, both in the negative and positive

ionization modes. Chromatography was performed with an UltiMate 3000 Quaternary Rapid Separation Pump (Thermo Scientific Dionex, Les Ulis, France) and the separation was performed under gradient elution using 4 different mobile phase systems consisting of mixtures of acetonitrile with either solvent A (10 mM pH 3.8 ammonium formate) for the positive ionization mode or solvent B (20 mM pH 9.2 ammonium carbonate) for the negative ionization mode.

A SeQuant 4.6 mm x 150 mm, 5  $\mu$ m i.d. ZIC-pHILIC column (AIT France, Houilles, France) was used for HILIC chromatography. For the positive ionization mode, gradient started with 5% solvent A until 3 min, then increased to reach 95% at 25 min and maintained for 5 more mins, then back to 5% and equilibrated for 10 mins. For the negative ionization mode, gradient started with 8% solvent B until 3 min, then increased to reach 92% at 25 min and maintained for 5 more mins, then back to 8% and equilibrated for 10 mins. Flow rate was 0.3 mL/min, curve gradient parameter set at 5, oven temperature 40°C and total run time 40 mins.

A Hypersil Gold C18 column 2.1 mm x 100 mm, 1.9  $\mu$ m i.d. (Thermo Scientific Dionex) was used for RP chromatography. For the positive ionization mode, gradient started with 90% solvent A until 3 min, then decreased to reach 5 % at 25 min and maintained for 8 more mins, then returning to 90% A for 5 mins. For the negative ionization mode, gradient started with 90% solvent B until 3 min, then decreased to reach 5 % at 25 min and maintained for 8 more mins, then returning to 90% B for 5 mins. Flow rate was 0.3 mL/min, oven temperature 40°C and total run time 40 mins.

Mass spectrometry was performed with an hybrid quadrupole – orbitrap Q-Exactive mass spectrometer (ThermoFisher) equipped with an heated electrospray ionization (ESI) source operating in positive (ESI+) or negative (ESI-) ionization modes. The ESI and acquisition parameters for the different modes are shown in Supplemental Table 1. Auxiliary gas heater temperature was set at 100°C, resolution at 70,000 and AGC target at  $10^6$ . The acquisition scan-

range was split into 3 segments as previously described [23]:  $m/z$  60-300; 300-600; 600-900. Xcalibur software (ThermoFisher) was used for system controlling and data acquisition.

#### **2.4.2. Gas chromatography-mass spectrometry**

Samples were prepared according to the method described by Fiehn [25]. For supernatants, 1 mL of acetonitrile/isopropanol/water (3:3:2) was added to 30  $\mu$ L of medium. The supernatant and cell samples were then vortexed for 10 s, shaken for 5 mins, centrifuged at 14 000 rpm for 2 mins. 450  $\mu$ L were recovered and dried under vacuum. The residue was reconstituted with 450  $\mu$ L of acetonitrile/water 50:50 (1:1) degassed with nitrogen and centrifuged for 2 mins at 14 000 rpm. The residue was reconstituted with 10  $\mu$ L of methoxyamine (MEOX) (20 mg/mL in pyridine), vortexed for 30 s, and kept at 30°C for 90 mins. Finally, 75  $\mu$ L of N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA) spiked with a mixture of FAME internal standards (10  $\mu$ L of FAMES for 1 mL of MSTFA) were added and the extract kept at 37°C for 30 mins. After derivatization the samples were immediately transferred into injection vials.

Gas chromatography was performed on a Trace 1300 system (ThermoFisher) with an Uptibond 5 Premium column 30 m x 0.25 mm x 0.25 mm (Interchim, Montluçon, France) and helium as a carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injection volume was 1  $\mu$ L. The temperature ramp was as follows: 60°C for 1 min, then an increase up to 325°C at 10°C/min. This temperature was maintained for 10 mins and total acquisition time was 37.5 mins. The detection was performed with a TSQ8000 mass spectrometer (ThermoFisher). The electron impact (EI) ion source was held at 230°C and an energy of 70 eV was used. Acquisition was performed in the full scan mode ( $m/z$  50–600) with an acquisition rate of 20 spectrum/s. Xcalibur software (ThermoFisher) was used for system controlling and data acquisition.

### 2.4.3. Data processing

LC-MS raw files were first converted to mzML and centroidized with msConvert [26], then processed using IPO [27] and XCMS (v1.50.1) [28] packages running under R. The CentWave algorithm [29] was used for automatic peak picking, with parameters optimized with IPO. For GC-MS, the raw files were converted to CDF format. The data were analyzed with Workflow4Metabolomics using the metaMS, XCMS and CAMERA packages [28, 30, 31] that extract the peaks, align them, correct the analytical drift and perform annotation of adducts and isotopes.

Features detected in biological samples with a mean intensity less than 3-fold the intensity observed in blank samples, or features detected in blank samples only were filtered out to limit the number of false positive peaks. Features with a CV greater than 30% in the quality control samples were also filtered out. Batch correction, quality control checks and statistics were performed with Workflow4Metabolomics [32, 33]. Statistical analysis was also performed with Workflow4Metabolomics and MetaboAnalyst 4.0 using uni- or multivariate analysis and pathway analysis based on Mummichog [34]. Levels of metabolite annotation were defined as follows: level 0, which is the strongest level of annotation and includes stereochemistry discrimination; level 1 that requires the use of a chemical standard and at least two orthogonal techniques (e.g., accurate mass and retention time); level 2 is confirmation by a class-specific standard; level 3 by one parameter (e.g., accurate mass); level 4 is the feature-level without annotation [35]. HMDB, The Golm Metabolome Database and NIST [36, 37] were used for database queries.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Untargeted metabolomic analysis**

For the intracellular metabolome, the combination of the different LC-MS and GC-MS methods allowed the detection of 42,573 features in control and LPS-treated samples (Table 1). HILIC was the most contributive, followed with RP chromatography and GC-MS and a total of 8,741 features were remaining after the filtering steps.

For the extracellular metabolome, 45,258 features were first detected, with 4,356 remaining after filtering (Table 2). RP chromatography allowed the detection of the highest number of features, followed with HILIC and GC-MS.

#### **3.2. Multivariate analysis**

Models were built with Partial Least-Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) for each condition and are shown in Figures 1A and 1B for the intracellular and extracellular metabolomes, respectively. The models for the intracellular metabolome allowed the distinction between control and treated cells with taking into account 2 components for the four analytical conditions. Each of these 2 components explained between 7.1 and 26.1% of the variability. On the other hand, with respect to the extracellular metabolome, 2 components were enough to discriminate control and treated cells for HILIC in the positive ionization mode, but 3 components were suggested by cross-validation to discriminate samples categories in the other analytical conditions. Although all models well fitted the data ( $R^2Y > 0.9$ ), their prediction capacity was poor with  $Q^2Y < 0.3$ , except for the analysis of the extracellular content with HILIC in the positive ionization mode ( $Q^2Y = 0.5$ ). The features contributing the most to each model (assessed with Variable Importance in Projection (VIP) score) were then used for hierarchical

clustering and for pathway analysis. Hierarchical clustering for the intracellular and extracellular metabolomes is depicted in Figures 2A and 2B, showing that an excellent categorization was achieved between control and LPS-treated macrophages for the majority of the different analytical conditions. Two categories of features, i.e. up- or down-regulated in control or LPS groups, are clearly distinguishable for the analysis of the intracellular content with HILIC in the positive and negative ionization mode.

### **3.3. Pathway analysis**

Pathway analysis for the LC-MS analysis of the intracellular content revealed differential expression of arachidonic acid metabolites in LPS-treated macrophages (Figure 3). Furthermore, GC-MS analysis suggested modulations in metabolites from tryptophan metabolism and Krebs cycle. Metabolites identified by the statistical analysis to be the most contributing to the different models are shown in Table 3, with most features corresponding to arachidonic acid metabolites. Since the production of arachidonic acid derivatives after stimulation of lung macrophages with LPS is already well documented [38-42], we then focused on the exploration of tryptophan metabolism and Krebs cycle pathway.

### **3.4. Targeted metabolic profiling**

Specific targeted LC-MS methods were developed for the quantitative analysis of selected compounds from tryptophan metabolism and Krebs cycle and the results are depicted in Figure 4. For tryptophan metabolism, a LPS-induced decrease in the tryptophan concentration and an increase in concentrations of compounds from the kynurenine pathway (kynurenine and quinolinic acid) were observed in both the intracellular and extracellular compartments. Accordingly, the concentration of hydroxytryptophan, a metabolite of the other tryptophan

degradation pathway leading to serotonin synthesis, was also increased in the intracellular content. For Krebs cycle metabolites, an increase in the concentration of malate was observed, whereas succinate and fumarate were found unaltered. In a similar model with murine bone-marrow derived macrophages [43], the increased malate production was explained by the induction of the arginosuccinate shunt, involving arginosuccinate, fumarate and malate. In line with this, intracellular arginosuccinate was measured in human lung macrophages and a 336% increase in the production was observed (Supplemental Figure 1).

## DISCUSSION

This study reports for the first time the metabolomic analysis of human primary lung macrophages, to assess the effect of LPS, the archetypal TLR agonist, on the cell metabolome. The methodological approach combined high-resolution LC-MS, with a split scan-range acquisition method providing improved feature detection when compared to classical methods [23], and GC-MS to provide the most extensive metabolome coverage. Metabolomics studies were previously performed with macrophages to assess the effects of drugs, plasticizers, pollutants and nanomaterials in mouse macrophage cell lines [44-47], to study the interactome in IFN- $\gamma$  or/and LPS-primed murine macrophages [48] or the cellular metabolism in HIV-infected human monocyte-derived macrophages [49]. Since the availability of human primary lung macrophages is limited and prolonged culture cannot be readily performed, alternative cellular models are commonly used as surrogate to study macrophage biology. Most frequently used surrogates consist in blood monocytes, monocyte-derived macrophages or phorbol ester-differentiated cell lines (e.g. U937, THP-1, HL60). However, important phenotypic differences were already reported between such surrogates and primary macrophages. For example, distinct patterns and expression levels of G-protein coupled receptors (including cytokine receptors) and ion channels were found between monocytes, cell lines and human alveolar macrophages [50]; peripheral blood monocytes exhibit no suppression by LPS of 5-lipoxygenase metabolism and no induction of iNOS compared to alveolar macrophages [41], LPS-stimulated human alveolar macrophages produce more PGE<sub>2</sub> than do blood monocytes [42] and the LPS-induced cytokine production is also higher in primary lung macrophages than in MDMs [51], highlighting the interest of confirming with primary cells the results obtained with available surrogates.

In addition to molecules from arachidonic acid metabolism, pathway analysis revealed a role for the tryptophan metabolism and Krebs cycle during macrophage M1 polarisation. The role of



eicosanoids in the macrophage inflammatory regulation and its resolution is already well established, with increased LPS-induced prostaglandin and leukotriene production [38-40] or the inhibitory role of PGE<sub>2</sub> in cytokine production [52-54]. Hydroxy-tryptophan, kynurenine and quinolinic acid are downstream metabolites of tryptophan metabolism and were quantified in the present study. Hydroxy-tryptophan is the precursor of serotonin, whereas kynurenine and quinolinic acid belong to the kynurenine pathway. Hence, the depletion of tryptophan is the consequence of both the LPS-induced increase in indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), leading to the formation of kynurenine metabolites, as described in human pulmonary macrophages [55] and to the increase in tryptophan hydroxylase (TPH) activity, also occurring in macrophages in inflammatory conditions [56]. The effectors of the kynurenine pathway, expressed in epithelial cells and alveolar macrophages, were previously shown to be critical regulators of acute pulmonary inflammation in a murine model of lung transplantation [57]. In infectious disease models, IDO expression is increased by respiratory syncytial virus in human monocyte-derived dendritic cells and by IFN- $\gamma$  and HIV in human monocyte-derived macrophages [58, 59] and quinolinate is increased by HIV in monocyte-derived macrophages [49]. In the clinics, increased IDO and TPH activities were strongly associated to 30-day death and or intensive care unit admission and/or 18 month mortality in patients with COPD exacerbations [60]; an increase in serum kynurenine and a decrease in tryptophan was observed in patients with pneumonia with correlations between IDO activity / kynurenine levels and severity or mortality [61], while kynurenine levels were associated with 28-day mortality in critically ill adult patients [62]. Our results also strongly support a major role for tryptophan metabolism in lung macrophages during inflammation, suggesting the interest of a pharmacological approach to modulate this pathway in inflammatory lung diseases.

Then, a large increase in the production of malate, one metabolite from the Krebs cycle, was observed in response to LPS, as previously reported in bone-marrow derived mouse macrophages [43, 48], whereas succinate and fumarate levels were unchanged. Other groups reported either very modest or larger increases in succinate after stimulation with LPS of murine bone-marrow derived macrophages, with key roles for succinate in the induction of IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$  [7, 43]. In their M1 polarisation model of murine bone-marrow derived macrophages, Jha and colleagues reported that malate accumulation was related to the induction of the arginosuccinate shunt, a pathway connecting the Krebs cycle with the urea cycle, involving aspartate, arginosuccinate, malate and fumarate. In their model, inhibiting this pathway with aminooxyacetic acid induced a concentration-dependant inhibition of the production of nitric oxide and IL-6, important effectors of antimicrobial activity and inflammatory reaction [43]. In line with these findings, we observed a 336% increase in the production of arginosuccinate in LPS-stimulated human lung macrophages, also suggesting a potential link between metabolism and immune functions in primary human cells.

All the changes in metabolite concentrations measured during the targeted analysis were consistent between the intracellular and extracellular compartments, suggesting that intracellularly produced metabolites may play an autocrine/paracrine role by being released in the cell environment in response to an inflammatory stimuli.

The main limit of the study is related to the patient population and sample size, which was limited to assess the effect of covariates such as age, smoking status or COPD. These covariates are known to affect the response of lung macrophages to TLR agonists; however, these changes greatly vary from one study to another. For example, some studies report increases in the LPS-induced cytokine production of alveolar macrophages from smoking or COPD patients [63, 64] whereas opposite findings were also reported by other groups [65, 66] and in other cases, current

smoking status had no effect on the production of cytokines in response to LPS [67, 68]. Altogether, these findings supports the concept whereby the LPS-induced production of cytokines by lung macrophages obtained from COPD, smokers, and healthy adults are similar, although this cannot be directly extrapolated to metabolomic analysis.

In conclusion, we described the use of an extensive combined GC- and LC-MS strategy for the metabolomic profiling of the LPS-induced M1 human lung macrophage polarization. The non-targeted analysis revealed the involvement of the arachidonic pathway, tryptophan metabolism and Krebs cycle during the M1 polarisation. Targeted analysis of selected compounds confirmed these findings and allowed the quantification of the identified metabolites and allowed to precise a role for the aspartate-arginosuccinate shunt. Knowing the role of macrophages in inflammatory lung diseases, a further detailed investigation of alterations occurring in these pathways in cells from patients with asthma or COPD should be of particular interest.

## TABLES

**Table 1:** Features detected in the intracellular metabolome analysis

<b>Analysis</b>	<b>Chromatography</b>	<b>Polarity</b>	<b>Initial number of features</b>	<b>After Filtering</b>
LC-MS	HILIC	+	16,588	2,935
		-	11,613	4,592
	RP	+	9,772	867
		-	4,407	154
GC-MS	GC	NA	-	193

**Table 2:** Features detected in the extracellular metabolome analysis

<b>Analysis</b>	<b>Chromatography</b>	<b>Polarity</b>	<b>Initial number of features</b>	<b>After Filtering</b>
LC-MS	HILIC	+	11,411	840
		-	17,821	1,055
	RP	+	14,426	2,160
		-	1,326	27
GC-MS	GC	NA	-	274

**Table 3:** Features differentially expressed between control and LPS samples in cell and supernatant samples.

Feature	<i>m/z</i>	RT	Ionization mode	Method	Log <sub>2</sub> (Fold Change)	Proposed molecular formula	Proposed annotation	Level ID	Δppm
<b>Intracellular</b>									
1	221.0919	18.5	Pos	HILIC	2.3	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxy-tryptophan	3	1
2	299.2003	7.3	Pos	HILIC	4.0	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	3,4-didehydro-retinoate	3	1
3	301.2163	7.6	Pos	HILIC	5.4	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	4-hydroxyretinal	3	0
4	305.0864	14.8	Pos	HILIC	1.2	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	-	3	1
5	317.2112	7.9	Pos	HILIC	4.4	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	15-deoxy-PGJ2	3	0
6	319.2270	7.7	Pos	HILIC	5.3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	Leukotriene A4	3	1
7	344.2438	18.4	Pos	HILIC	3.7	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>5</sub>	-	4	2
8	393.2260	7.4	Pos	HILIC	5.7	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>6</sub>	10-hydroperoxy-H4-neuroprostane	3	3
9	120.0449	4.9	Neg	HILIC	4.0	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO	-	3	4
10	164.0346	4.9	Neg	HILIC	3.8	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	Pyridoxolactone	3	4
11	167.0171	17.7	Neg	HILIC	2.2	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	-	4	7
12	194.0451	3.8	Neg	HILIC	6.7	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	Hydroxyhippuric acid	3	4
13	315.1952	7.2	Neg	HILIC	4.9	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	15-deoxy-PGJ2	3	4
14	333.2061	7.1	Neg	HILIC	8.7	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	Prostaglandin A2	3	3
15	334.2095	5.2	Neg	HILIC	5.0	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	-	4	4
16	351.2160	7.1	Neg	HILIC	4.8	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	Thromboxane A2	3	5
17	353.2325	9.7	Neg	HILIC	2.7	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	Prostaglandin E1	3	2
18	368.2432	10.4	Neg	HILIC	5.1	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>5</sub>	-	4	1
19	381.2632	8.9	Neg	HILIC	10.3	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	-	3	4
20	383.2425	5.1	Neg	HILIC	5.5	C <sub>21</sub> H <sub>35</sub> O <sub>6</sub>	-	4	3
21	385.2217	14.9	Neg	HILIC	2.8	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Dihydro-trihydroxy-leukotriene B4	3	4
22	436.1933	7.0	Neg	HILIC	5.4	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	-	4	3
23	387.1448	18.7	Pos	RP	9.5	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	-	3	3
24	134.1	12.40	-	GC	8.4	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Malic acid	1	
25	167.0	15.19	-	GC	1.3	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>4</sub>	Quinolinic acid	1	
<b>Extracellular</b>									
1	136.0398	14.56	Pos	HILIC	8.3	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	-	3	
2	405.2630	7.25	Pos	HILIC	3.4	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	-	3	
3	757.4305	7.60	Pos	HILIC	6.3	C <sub>39</sub> H <sub>64</sub> O <sub>14</sub>	-	3	
4	334.2115	6.0	Neg	HILIC	3.9	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	-	5	2
5	351.2190	6.79	Neg	HILIC	3.6	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	Prostaglandin E2	3	

**Supplemental Table 1:** Mass spectrometry parameters for HILIC and reverse phase chromatography with positive or negative electrospray ionisation.

<b>Parameter</b>	<b>HILIC +</b>	<b>HILIC -</b>	<b>RP +</b>	<b>RP -</b>
Injection time (ms)	250	250	100	100
Sheath gas flow rate	60	50	40	50
Auxiliary gas flow rate	30	25	25	25
Spray voltage (kV)	2,800	2,500	4,000	2,700
Temperature capillary (°C)	325	275	275	325
S-lens RF level	155	100	100	85

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1.** Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) of the intracellular (A) and extracellular (B) HILIC, RP and GC-MS analysis of the human macrophage metabolome ( $n = 10$ ) in cells cultured for 24 hrs with (green) or without (red) LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ).

**Figure 2.** Hierarchical clustering analysis of the top 50 differentially expressed metabolites for the intracellular (A) and extracellular (B) HILIC, RP and GC-MS analysis of the human macrophage metabolome ( $n = 10$ ) in cells cultured for 24 hrs with (green) or without (red) LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Metabolites in red are upregulated, those in blue downregulated.

**Figure 3.** Pathway network mapping for the untargeted metabolomic analysis of intracellular arachidonic acid metabolism in human lung macrophages. Nodes that are significantly enriched in the pathway are fully colored and larger than non-enriched nodes. Pathway analysis was performed with MetaboAnalyst.

**Figure 4.** Quantification of selected intracellular (A) and extracellular (B) metabolites from tryptophan metabolism and Krebs cycle in human lung macrophages cultured for 24 hrs with or without (control) LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Data are expressed in pg per  $10^6$  cells. ND: not detected.



# Figures

## Figure 1.

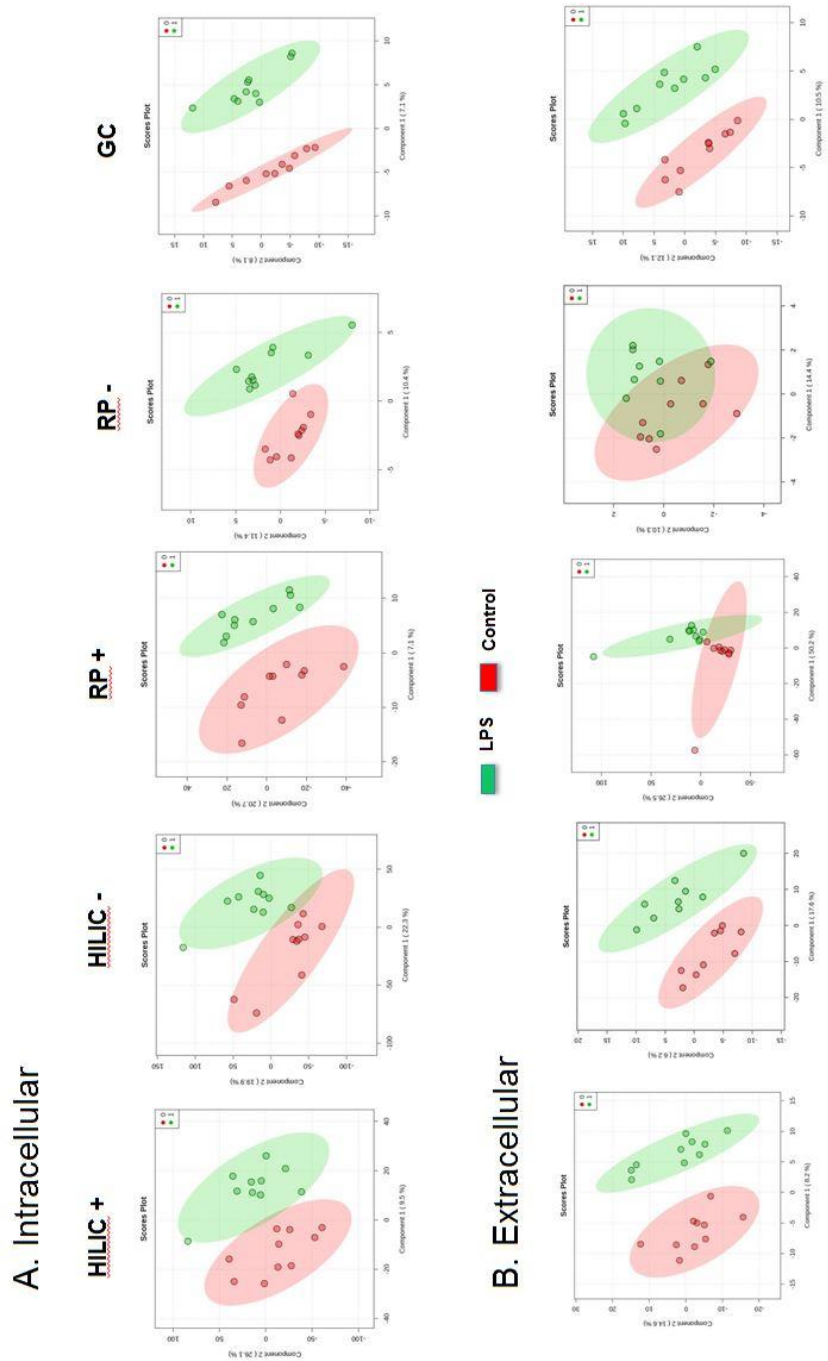
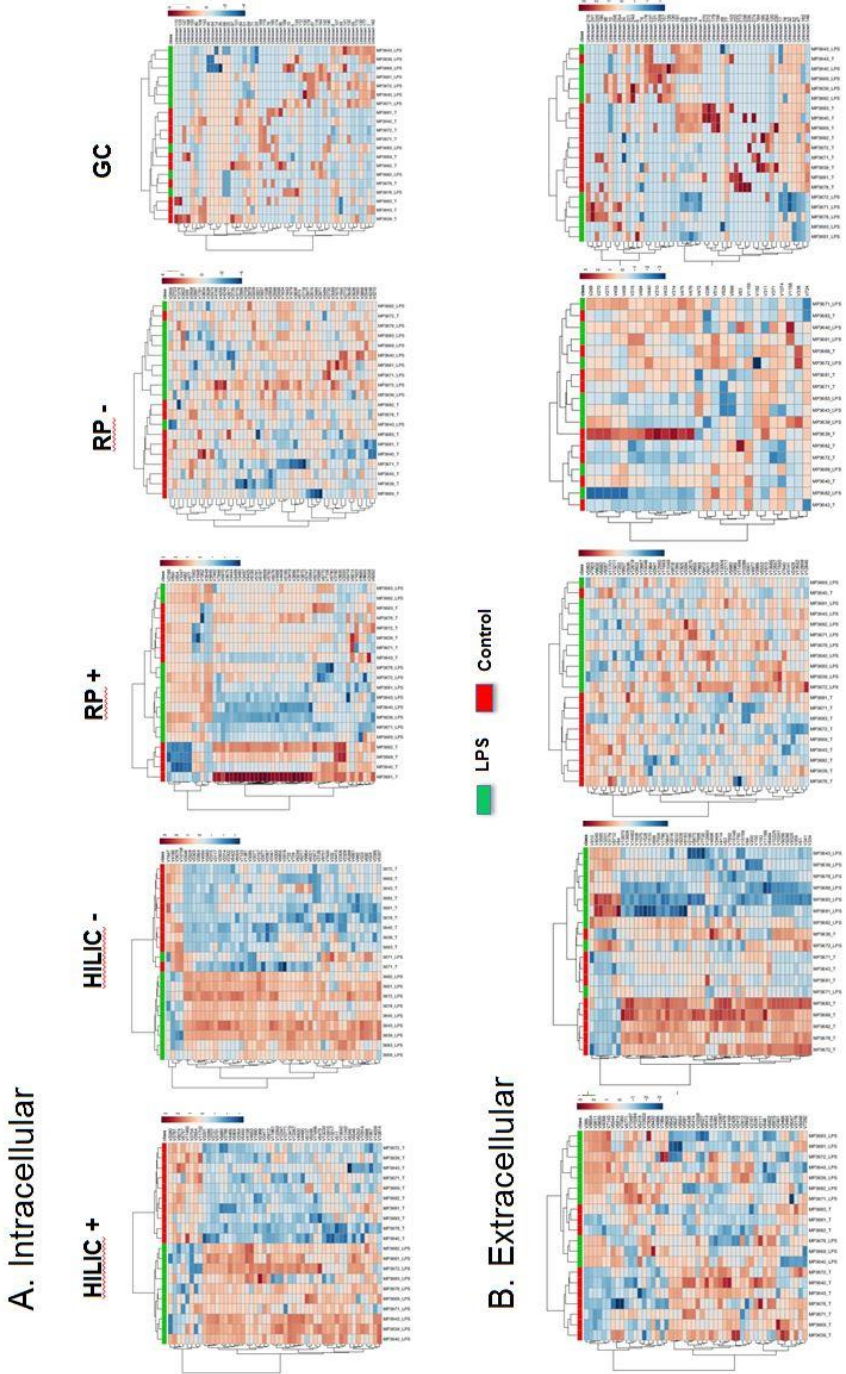


Figure 2.



**Figure 3.**

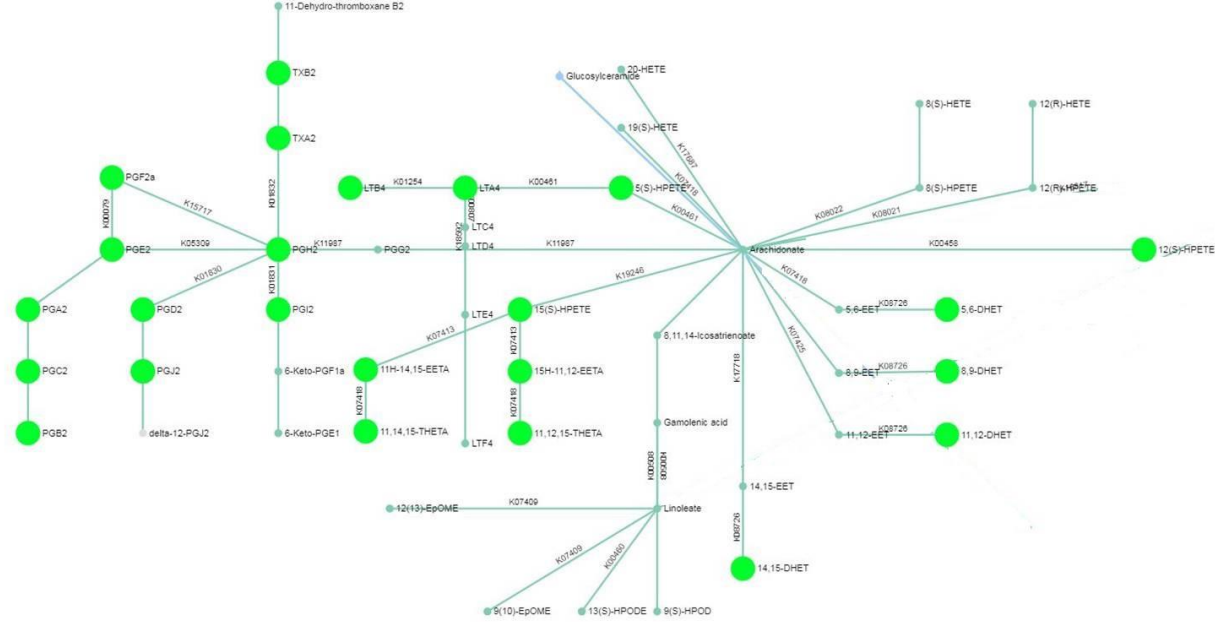
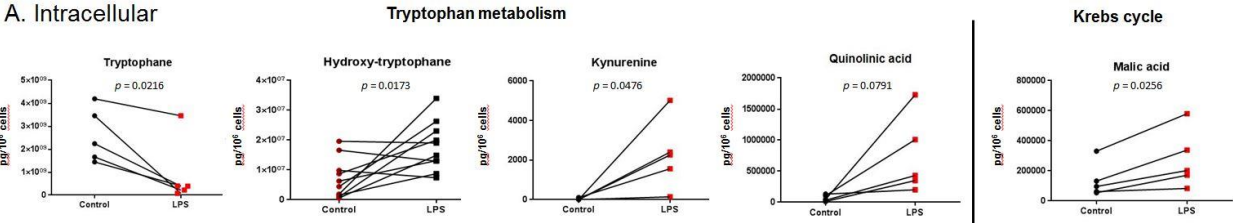
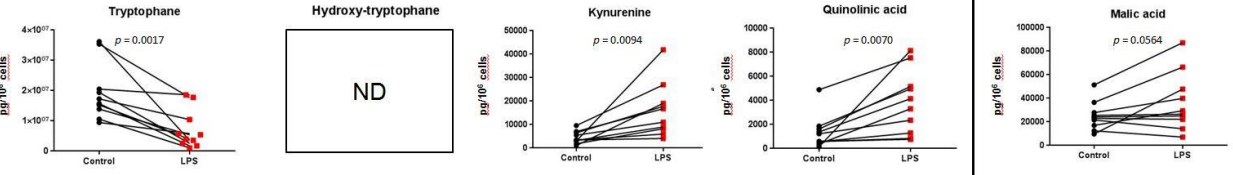


Figure 4.

A. Intracellular



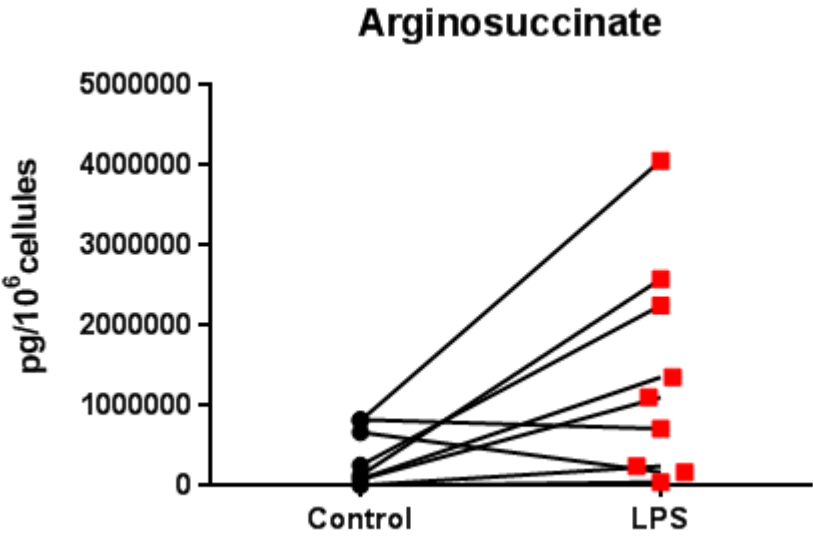
B. Extracellular



## LEGENDS TO SUPPLEMENTARY FIGURE

**Supplementary Figure 1.** Quantification of intracellular arginosuccinate in human lung macrophages cultured for 24 hrs with or without (control) LPS ( $10 \text{ ng.mL}^{-1}$ ). Data are expressed in pg per  $10^6$  cells.

Supplementary Figure 1.



## **COMPETING INTERESTS STATEMENT**

The authors have nothing to declare.

## **FUNDING SOURCES**

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research (PhD grant, Fanta Fall) and by the Chancellerie des Universités de Paris (Legs Gaston Poix).

## REFERENCES

1. Grassin-Delyle S, Abrial C, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. The Role of Toll-Like Receptors in the Production of Cytokines by Human Lung Macrophages. *J Innate Immun.* 2018;1-11. doi: 10.1159/000494463. PubMed PMID: 30557876.
2. Abrial C, Grassin-Delyle S, Salvator H, Brollo M, Naline E, Devillier P. 15-Lipoxygenases regulate the production of chemokines in human lung macrophages. *British journal of pharmacology.* 2015;172(17):4319-30. doi: 10.1111/bph.13210. PubMed PMID: 26040494; PubMed Central PMCID: PMC4556470.
3. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology.* 2015;16(4):343-53. doi: 10.1038/ni.3123. PubMed PMID: 25789684; PubMed Central PMCID: PMC4507498.
4. Pinheiro CDS, Monteiro APT, Dutra FF, Bozza MT, Peters-Golden M, Benjamim CF, et al. Short-Term Regulation of FcγR-Mediated Phagocytosis by TLRs in Macrophages: Participation of 5-Lipoxygenase Products. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:2086840. doi: 10.1155/2017/2086840. PubMed PMID: 28894350; PubMed Central PMCID: PMC5574301.
5. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell metabolism.* 2012;15(4):432-7. doi: 10.1016/j.cmet.2011.11.013. PubMed PMID: 22482726.
6. Zaslona Z, Palsson-McDermott EM, Menon D, Haneklaus M, Flis E, Prendeville H, et al. The Induction of Pro-IL-1β by Lipopolysaccharide Requires Endogenous Prostaglandin E<sub>2</sub> Production. *J Immunol.* 2017;198(9):3558-64. doi: 10.4049/jimmunol.1602072. PubMed PMID: 28298525.



7. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature*. 2013;496(7444):238-42. doi: 10.1038/nature11986. PubMed PMID: 23535595; PubMed Central PMCID: PMC4031686.
8. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*. 2016;167(2):457-70 e13. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.064. PubMed PMID: 27667687; PubMed Central PMCID: PMC45863951.
9. Fensterheim BA, Young JD, Luan L, Kleinbard RR, Stothers CL, Patil NK, et al. The TLR4 Agonist Monophosphoryl Lipid A Drives Broad Resistance to Infection via Dynamic Reprogramming of Macrophage Metabolism. *J Immunol*. 2018;200(11):3777-89. doi: 10.4049/jimmunol.1800085. PubMed PMID: 29686054; PubMed Central PMCID: PMC5964009.
10. Gleeson LE, Sheedy FJ, Palsson-McDermott EM, Triglia D, O'Leary SM, O'Sullivan MP, et al. Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis Induces Aerobic Glycolysis in Human Alveolar Macrophages That Is Required for Control of Intracellular Bacillary Replication. *J Immunol*. 2016;196(6):2444-9. doi: 10.4049/jimmunol.1501612. PubMed PMID: 26873991.
11. Mills EL, Ryan DG, Prag HA, Dikovskaya D, Menon D, Zaslona Z, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*. 2018;556(7699):113-7. doi: 10.1038/nature25986. PubMed PMID: 29590092; PubMed Central PMCID: PMC6047741.
12. Ryan DG, Murphy MP, Frezza C, Prag HA, Chouchani ET, O'Neill LA, et al. Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer. *Nat Metab*. 2019;1:16-33. doi:

10.1038/s42255-018-0014-7. PubMed PMID: 31032474; PubMed Central PMCID: PMCPMC6485344.

13. McGettrick AF, O'Neill LA. How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation. *J Biol Chem*. 2013;288(32):22893-8. doi: 10.1074/jbc.R113.486464. PubMed PMID: 23798679; PubMed Central PMCID: PMCPMC3743468.

14. Byers DE, Holtzman MJ. Alternatively activated macrophages and airway disease. *Chest*. 2011;140(3):768-74. Epub 2011/09/08. doi: 140/3/768 [pii]

10.1378/chest.10-2132. PubMed PMID: 21896520; PubMed Central PMCID: PMC3168852.

15. Dasgupta P, Keegan AD. Contribution of alternatively activated macrophages to allergic lung inflammation: a tale of mice and men. *J Innate Immun*. 2012;4(5-6):478-88. Epub 2012/03/24. doi: 000336025 [pii]

10.1159/000336025. PubMed PMID: 22440980.

16. Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, et al. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med*. 2008;14(6):633-40. Epub 2008/05/20. doi: nm1770 [pii]

10.1038/nm1770. PubMed PMID: 18488036; PubMed Central PMCID: PMC2575848.

17. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol*. 2008;181(6):3733-9. Epub 2008/09/05. doi: 181/6/3733 [pii]. PubMed PMID: 18768823.

18. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P, et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers.

American journal of respiratory and critical care medicine. 2011;184(6):662-71. doi: 10.1164/rccm.201104-0597OC. PubMed PMID: 21680942.

19. Busse WW, Lemanske RF, Jr., Gern JE. Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet*. 2010;376(9743):826-34. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61380-3. PubMed PMID: 20816549; PubMed Central PMCID: PMC2972660.

20. Xie N, Cui H, Ge J, Banerjee S, Guo S, Dubey S, et al. Metabolic characterization and RNA profiling reveal glycolytic dependence of profibrotic phenotype of alveolar macrophages in lung fibrosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2017;313(5):L834-L44. doi: 10.1152/ajplung.00235.2017. PubMed PMID: 28798256; PubMed Central PMCID: PMC5792180.

21. Mould KJ, Barthel L, Mohning MP, Thomas SM, McCubbrey AL, Danhorn T, et al. Cell Origin Dictates Programming of Resident versus Recruited Macrophages during Acute Lung Injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017;57(3):294-306. doi: 10.1165/rcmb.2017-0061OC. PubMed PMID: 28421818; PubMed Central PMCID: PMC5625228.

22. Gleeson LE, O'Leary SM, Ryan D, McLaughlin AM, Sheedy FJ, Keane J. Cigarette Smoking Impairs the Bioenergetic Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2018;59(5):572-9. doi: 10.1165/rcmb.2018-0162OC. PubMed PMID: 29944387.

23. Fall F, Lenuzza N, Lamy E, Brollo M, Naline E, Devillier P, et al. A split-range acquisition method for the non-targeted metabolomic profiling of human plasma with hydrophilic interaction chromatography - high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019;1128:121780. doi: 10.1016/j.jchromb.2019.121780. PubMed PMID: 31479891.

24. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-7. doi: 10.1139/o59-099. PubMed PMID: 13671378.
25. Fiehn O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Curr Protoc Mol Biol.* 2016;114:30 4 1- 4 2. doi: 10.1002/0471142727.mb3004s114. PubMed PMID: 27038389; PubMed Central PMCID: PMC4829120.
26. Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D, Mallick P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics.* 2008;24(21):2534-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btn323. PubMed PMID: 18606607; PubMed Central PMCID: PMC2732273.
27. Libiseller G, Dvorzak M, Kleb U, Gander E, Eisenberg T, Madeo F, et al. IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:118. doi: 10.1186/s12859-015-0562-8. PubMed PMID: 25888443; PubMed Central PMCID: PMC4404568.
28. Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry.* 2006;78(3):779-87. doi: 10.1021/ac051437y. PubMed PMID: 16448051.
29. Tautenhahn R, Bottcher C, Neumann S. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:504. doi: 10.1186/1471-2105-9-504. PubMed PMID: 19040729; PubMed Central PMCID: PMC2639432.
30. Wehrens R, Weingart G, Mattivi F. metaMS: an open-source pipeline for GC-MS-based untargeted metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014;966:109-16. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.02.051. PubMed PMID: 24656939.

31. Kuhl C, Tautenhahn R, Bottcher C, Larson TR, Neumann S. CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical chemistry*. 2012;84(1):283-9. doi: 10.1021/ac202450g. PubMed PMID: 22111785; PubMed Central PMCID: PMC3658281.
32. Guitton Y, Tremblay-Franco M, Le Corguille G, Martin JF, Petera M, Roger-Mele P, et al. Create, run, share, publish, and reference your LC-MS, FIA-MS, GC-MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;93:89-101. doi: 10.1016/j.biocel.2017.07.002. PubMed PMID: 28710041.
33. Giacomoni F, Le Corguille G, Monsoor M, Landi M, Pericard P, Petera M, et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*. 2015;31(9):1493-5. doi: 10.1093/bioinformatics/btu813. PubMed PMID: 25527831; PubMed Central PMCID: PMC4410648.
34. Li S, Park Y, Duraisingham S, Strobel FH, Khan N, Soltow QA, et al. Predicting network activity from high throughput metabolomics. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(7):e1003123. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003123. PubMed PMID: 23861661; PubMed Central PMCID: PMC3701697.
35. Chaleckis R, Meister I, Zhang P, Wheelock CE. Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC-MS-based metabolomics. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;55:44-50. doi: 10.1016/j.copbio.2018.07.010. PubMed PMID: 30138778.
36. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vazquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D608-D17. doi: 10.1093/nar/gkx1089. PubMed PMID: 29140435; PubMed Central PMCID: PMC5753273.

37. Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E, et al. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics*. 2005;21(8):1635-8. doi: 10.1093/bioinformatics/bti236. PubMed PMID: 15613389.
38. Suzuki K, Yamamoto T, Sato A, Murayama T, Amitani R, Yamamoto K, et al. Lipopolysaccharide primes human alveolar macrophages for enhanced release of superoxide anion and leukotriene B4: self-limitations of the priming response with protein synthesis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1993;8(5):500-8. doi: 10.1165/ajrcmb/8.5.500. PubMed PMID: 8386927.
39. O'Sullivan MG, Chilton FH, Huggins EM, Jr., McCall CE. Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(21):14547-50. PubMed PMID: 1634505.
40. Rankin JA, Sylvester I, Smith S, Yoshimura T, Leonard EJ. Macrophages cultured in vitro release leukotriene B4 and neutrophil attractant/activation protein (interleukin 8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. *J Clin Invest*. 1990;86(5):1556-64. doi: 10.1172/JCI114875. PubMed PMID: 2173722; PubMed Central PMCID: PMCPMC296903.
41. Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M. Prolonged exposure to lipopolysaccharide inhibits macrophage 5-lipoxygenase metabolism via induction of nitric oxide synthesis. *Journal of immunology*. 2000;165(7):3592-8. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3592. PubMed PMID: 11034360.
42. Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest*. 1994;93(1):391-6. doi: 10.1172/JCI116971. PubMed PMID: 8282809; PubMed Central PMCID: PMCPMC293791.

43. Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*. 2015;42(3):419-30. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.005. PubMed PMID: 25786174.
44. Adamson SX, Wang R, Wu W, Cooper B, Shannahan J. Metabolomic insights of macrophage responses to graphene nanoplatelets: Role of scavenger receptor CD36. *PLoS One*. 2018;13(11):e0207042. doi: 10.1371/journal.pone.0207042. PubMed PMID: 30403754; PubMed Central PMCID: PMC6221354.
45. Zhao C, Tang Z, Yan J, Fang J, Wang H, Cai Z. Bisphenol S exposure modulate macrophage phenotype as defined by cytokines profiling, global metabolomics and lipidomics analysis. *Sci Total Environ*. 2017;592:357-65. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.035. PubMed PMID: 28319722.
46. Sapcariu SC, Kanashova T, Dilger M, Diabate S, Oeder S, Passig J, et al. Metabolic Profiling as Well as Stable Isotope Assisted Metabolic and Proteomic Analysis of RAW 264.7 Macrophages Exposed to Ship Engine Aerosol Emissions: Different Effects of Heavy Fuel Oil and Refined Diesel Fuel. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157964. doi: 10.1371/journal.pone.0157964. PubMed PMID: 27348622; PubMed Central PMCID: PMC4922672.
47. Wu X, Cao H, Zhao L, Song J, She Y, Feng Y. Metabolomic analysis of glycerophospholipid signatures of inflammation treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs-induced-RAW264.7 cells using <sup>1</sup>H NMR and U-HPLC/Q-TOF-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1028:199-215. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.06.032. PubMed PMID: 27371817.
48. Rattigan KM, Pountain AW, Regnault C, Achcar F, Vincent IM, Goodyear CS, et al. Metabolomic profiling of macrophages determines the discrete metabolomic signature and

metabolomic interactome triggered by polarising immune stimuli. *PLoS One*. 2018;13(3):e0194126. doi: 10.1371/journal.pone.0194126. PubMed PMID: 29538444; PubMed Central PMCID: PMC5851634.

49. Hollenbaugh JA, Montero C, Schinazi RF, Munger J, Kim B. Metabolic profiling during HIV-1 and HIV-2 infection of primary human monocyte-derived macrophages. *Virology*. 2016;491:106-14. doi: 10.1016/j.virol.2016.01.023. PubMed PMID: 26895248; PubMed Central PMCID: PMC4834987.

50. Groot-Kormelink PJ, Fawcett L, Wright PD, Gosling M, Kent TC. Quantitative GPCR and ion channel transcriptomics in primary alveolar macrophages and macrophage surrogates. *BMC Immunol*. 2012;13:57. doi: 10.1186/1471-2172-13-57. PubMed PMID: 23102269; PubMed Central PMCID: PMC3542584.

51. Victoni T, Salvator H, Abrial C, Brollo M, Porto LCS, Lagente V, et al. Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of beta2-adrenoceptor agonists on cytokine release. *Respiratory research*. 2017;18(1):126. doi: 10.1186/s12931-017-0613-y. PubMed PMID: 28637505; PubMed Central PMCID: PMC5480184.

52. Gill SK, Yao Y, Kay LJ, Bewley MA, Marriott HM, Peachell PT. The anti-inflammatory effects of PGE<sub>2</sub> on human lung macrophages are mediated by the EP4 receptor. *Br J Pharmacol*. 2016;173(21):3099-109. doi: 10.1111/bph.13565. PubMed PMID: 27460634; PubMed Central PMCID: PMC5056231.

53. Birrell MA, Maher SA, Dekkak B, Jones V, Wong S, Brook P, et al. Anti-inflammatory effects of PGE<sub>2</sub> in the lung: role of the EP4 receptor subtype. *Thorax*. 2015;70(8):740-7. doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-206592. PubMed PMID: 25939749; PubMed Central PMCID: PMC4516010.



54. Ratcliffe MJ, Walding A, Shelton PA, Flaherty A, Dougall IG. Activation of E-prostanoid4 and E-prostanoid2 receptors inhibits TNF-alpha release from human alveolar macrophages. *Eur Respir J.* 2007;29(5):986-94. doi: 10.1183/09031936.00131606. PubMed PMID: 17331962.
55. Briand G, Devillier P. Implication de la voie des kynurénines dans la polarisation des macrophages pulmonaires humains. *Rev Mal Respir.* 2014;31(9):879. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2014.06.007>.
56. Alberati-Giani D, Ricciardi-Castagnoli P, Kohler C, Cesura AM. Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. *J Neurochem.* 1996;66(3):996-1004. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66030996.x. PubMed PMID: 8769859.
57. Lee SM, Park HY, Suh YS, Yoon EH, Kim J, Jang WH, et al. Inhibition of acute lethal pulmonary inflammation by the IDO-AhR pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(29):E5881-E90. doi: 10.1073/pnas.1615280114. PubMed PMID: 28673995; PubMed Central PMCID: PMC5530642.
58. Maneglier B, Malleret B, Guillemin GJ, Spreux-Varoquaux O, Devillier P, Rogez-Kreuz C, et al. Modulation of indoleamine-2,3-dioxygenase expression and activity by HIV-1 in human macrophages. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009;23(5):573-81. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00703.x. PubMed PMID: 19656212.
59. Ajamian F, Wu Y, Ebeling C, Ilarraza R, Odemuyiwa SO, Moqbel R, et al. Respiratory syncytial virus induces indoleamine 2,3-dioxygenase activity: a potential novel role in the development of allergic disease. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* 2015;45(3):644-59. doi: 10.1111/cea.12498. PubMed PMID: 25627660.

60. Meier MA, Ottiger M, Vogeli A, Steuer C, Bernasconi L, Thomann R, et al. Activation of the Serotonin Pathway is Associated with Poor Outcome in COPD Exacerbation: Results of a Long-Term Cohort Study. *Lung*. 2017;195(3):303-11. doi: 10.1007/s00408-017-0004-7. PubMed PMID: 28434116.
61. Suzuki Y, Suda T, Yokomura K, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, et al. Serum activity of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts prognosis of community-acquired pneumonia. *J Infect*. 2011;63(3):215-22. doi: 10.1016/j.jinf.2011.07.003. PubMed PMID: 21784100.
62. Rogers AJ, McGeachie M, Baron RM, Gazourian L, Haspel JA, Nakahira K, et al. Metabolomic derangements are associated with mortality in critically ill adult patients. *PloS one*. 2014;9(1):e87538. doi: 10.1371/journal.pone.0087538. PubMed PMID: 24498130; PubMed Central PMCID: PMC3907548.
63. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med*. 2004;200(5):689-95. doi: 10.1084/jem.20040416. PubMed PMID: 15337792; PubMed Central PMCID: PMC2212744.
64. Hodge S, Matthews G, Mukaro V, Ahern J, Shivam A, Hodge G, et al. Cigarette smoke-induced changes to alveolar macrophage phenotype and function are improved by treatment with procysteine. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;44(5):673-81. doi: 10.1165/rcmb.2009-0459OC. PubMed PMID: 20595463.
65. Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE. Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists. *J Immunol*. 2007;179(9):6097-106. PubMed PMID: 17947684.

66. Armstrong J, Sargent C, Singh D. Glucocorticoid sensitivity of lipopolysaccharide-stimulated chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2009;158(1):74-83. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03986.x. PubMed PMID: 19737233; PubMed Central PMCID: PMC2759061.
67. Armstrong J, Harbron C, Lea S, Booth G, Cadden P, Wreggett KA, et al. Synergistic effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition with a corticosteroid in alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;338(3):732-40. doi: 10.1124/jpet.111.180737. PubMed PMID: 21610141.
68. Higham A, Booth G, Lea S, Southworth T, Plumb J, Singh D. The effects of corticosteroids on COPD lung macrophages: a pooled analysis. *Respiratory research.* 2015;16:98. doi: 10.1186/s12931-015-0260-0. PubMed PMID: 26289362; PubMed Central PMCID: PMC4545868.

## RESULTATS COMPLÉMENTAIRES ARTICLE 2

### 1. Polarisation M2

Tout comme pour la polarisation M1, les macrophages pulmonaires humains ont été isolés et mis en culture pendant 24 heures avec  $10 \text{ ng.mL}^{-1}$  d'IL-4 pour favoriser la différenciation des macrophages en un profil M2. La procédure d'extraction, de récupération et d'analyse des données est la même que les macrophages M1. La détection des pics par XCMS et les filtres appliqués sont les mêmes que pour les groupes LPS et témoins.

Les résultats des expériences réalisées en analyse HILIC positif et négatif sur le contenu intracellulaire et extracellulaire des macrophages pulmonaires sont présentés ci-après.

L'analyse PLS-DA des cellules ne montre pas de séparation apparente entre le groupe témoin et IL-4 pour le mode positif et le mode négatif. Cependant pour l'HILIC positif, les composantes principales 1 et 2 représentent 34,6% ( $PC1=24,7$  ;  $PC2=9,9$ ) de la variance entre les deux groupes d'échantillons. En mode négatif, les composantes principales 1 et 2 représentent 42,1% ( $PC1=29,8$  ;  $PC2=12,3$ ) de la variance. Pour les cellules l'analyse PLS-DA ne montre pas de significativité entre les deux groupes étudiés. Pour les surnageants, l'analyse HILIC positif montre deux groupes d'échantillons séparés et 20,3 % ( $PC1=11,2$  ;  $PC2=9,1$ ) de cette variance est expliquée par les PC1 et PC2. L'HILIC négatif montre que 22,7 % ( $PC1=15,3$  ;  $PC2=7,4$ ) de la variance entre les deux groupes est expliquée par PC1 et PC2 (Figure 27).

La valeur de  $Q^2Y$  doit être comprise entre [0,1]. Plus la valeur de  $Q^2Y$  est élevée, meilleures sont les performances de l'analyse. Le modèle est considéré comme acceptable si les valeurs  $Q^2Y > 0,5$  et excellent si  $Q^2Y > 0,9$ .

Les valeurs de  $R^2Y$  et  $Q^2Y$  ont aussi été évaluées. Pour l'ensemble des analyses PLS-DA les valeurs de  $R^2Y$  restent inférieures à 0,8 pour la troisième composante principale et les valeurs de  $Q^2Y$  inférieures à 0,3. Toutes nos valeurs de  $Q^2Y$  étaient largement inférieures à 0,5 malgré une séparation apparente dans certaines PLS-DA ce qui signifie que la performance prédictive est mauvaise.

La valeur de  $R^2Y$  augmente au fur-et-à-mesure que l'on ajoute de nouvelles composantes.  $Q^2Y$  est utile pour sélectionner le nombre optimal de composantes pour le modèle PLS car contrairement à  $R^2Y$ , elle atteint généralement un maximum qui indique qu'au-delà les

valeurs deviennent moins intéressantes. Plus R2Y est grand (=1) mieux est le modèle. La différence entre R2Y et Q2Y ne doit pas être grande [259].

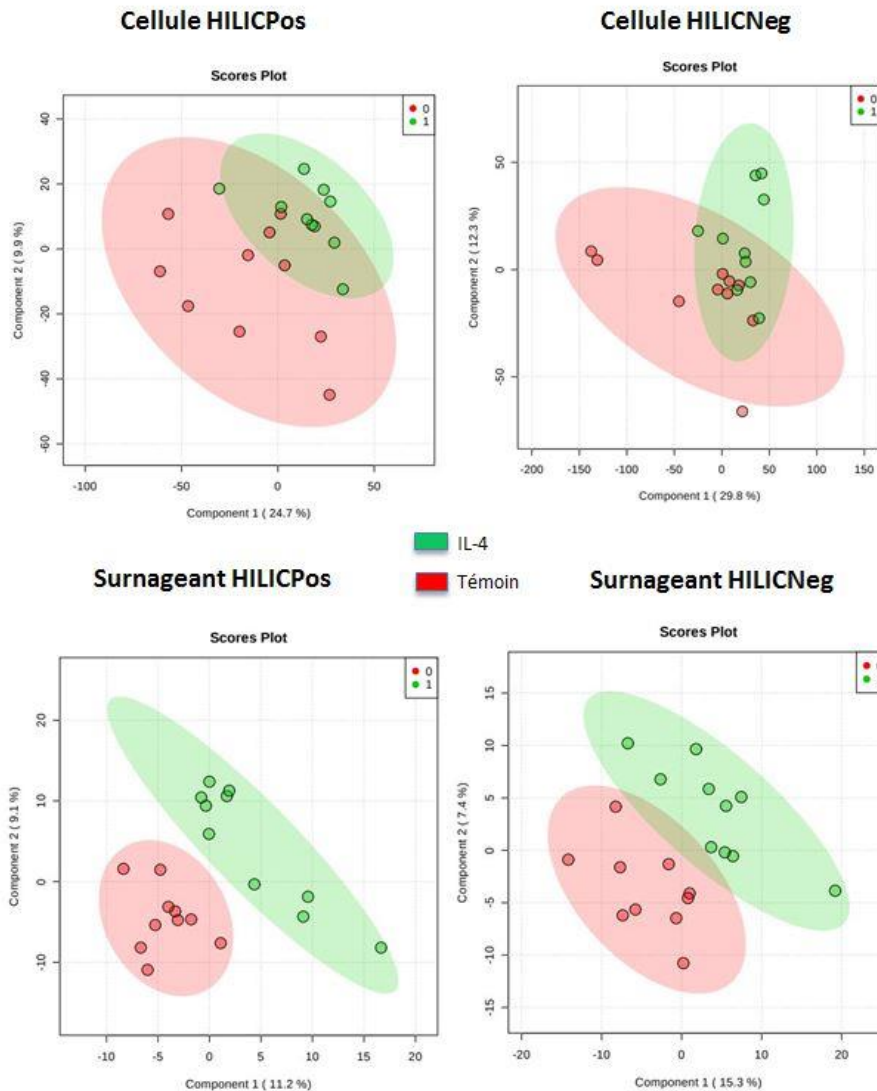


Figure 27 : Analyse en mode positif et négatif PLS-DA des cellules et surnageant des macrophages pulmonaires humains

## RESULTATS : PARTIE II – APPLICATIONS AUX MACROPHAGES PULMONAIRES HUMAINS

Les scores VIP sont représentés et expliquent l'importance des 25 premières variables dans le modèle PLS-DA. Le score VIP d'une variable est calculé comme la somme pondérée des corrélations au carré entre les composantes PLS-DA et la variable originale. Les pondérations correspondent à la variation en pourcentage expliquée par la composante PLS-DA du modèle. Le score VIP est considéré comme pertinent lorsque  $> 1,5$  [260].

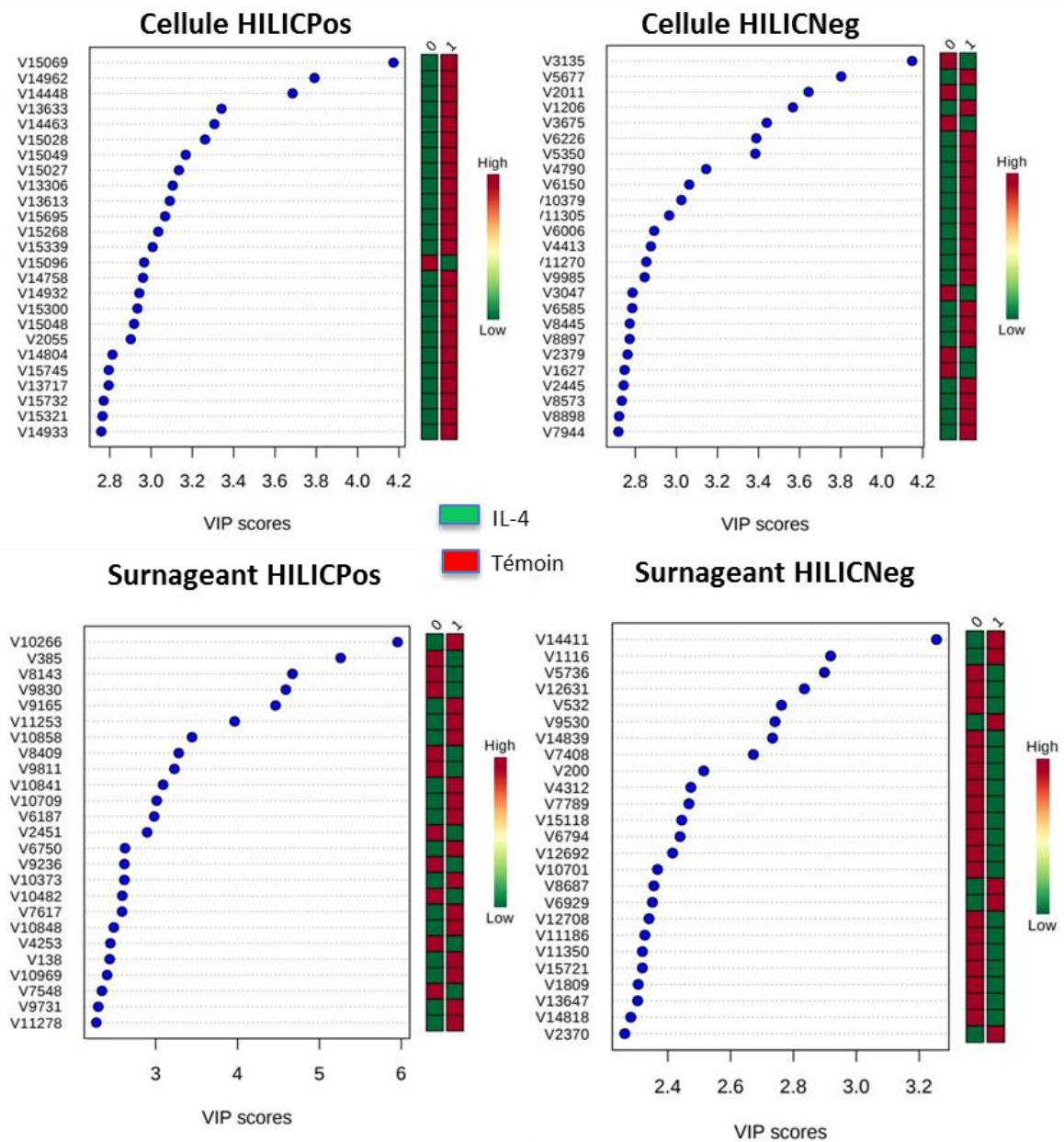


Figure 28 : Représentation des variables discriminantes entre les groupes témoins et IL-4 et VIP score. En ordonnées les variables et en abscisse les valeurs des scores VIP

Une classification hiérarchique a été effectuée pour distinguer les 50 premières variables différemment exprimées dans les groupes témoins et IL-4. Elle propose une structuration hiérarchique des observations en fonction de leur proximité dans l'espace des variables. Pour le contenu intracellulaire, en mode positif on peut voir une séparation entre les groupes témoins et IL-4. On observe 1 échantillon sur les 10 isolé du groupe des macrophages IL-4. Pour l'HILIC négatif, le heatmap ne montre pas de séparation en fonction d'une majorité d'échantillon dans une condition. L'analyse du contenu extracellulaire en HILIC positif aussi ne montre pas une séparation homogène des groupes d'échantillons. L'analyse HILIC négatif montre une séparation des IL-4 en deux groupes de 8 et 2 échantillons mais les échantillons témoins sont regroupés. Certaines variables sont alors exprimées différemment en fonction du l'état de polarisation du macrophage.

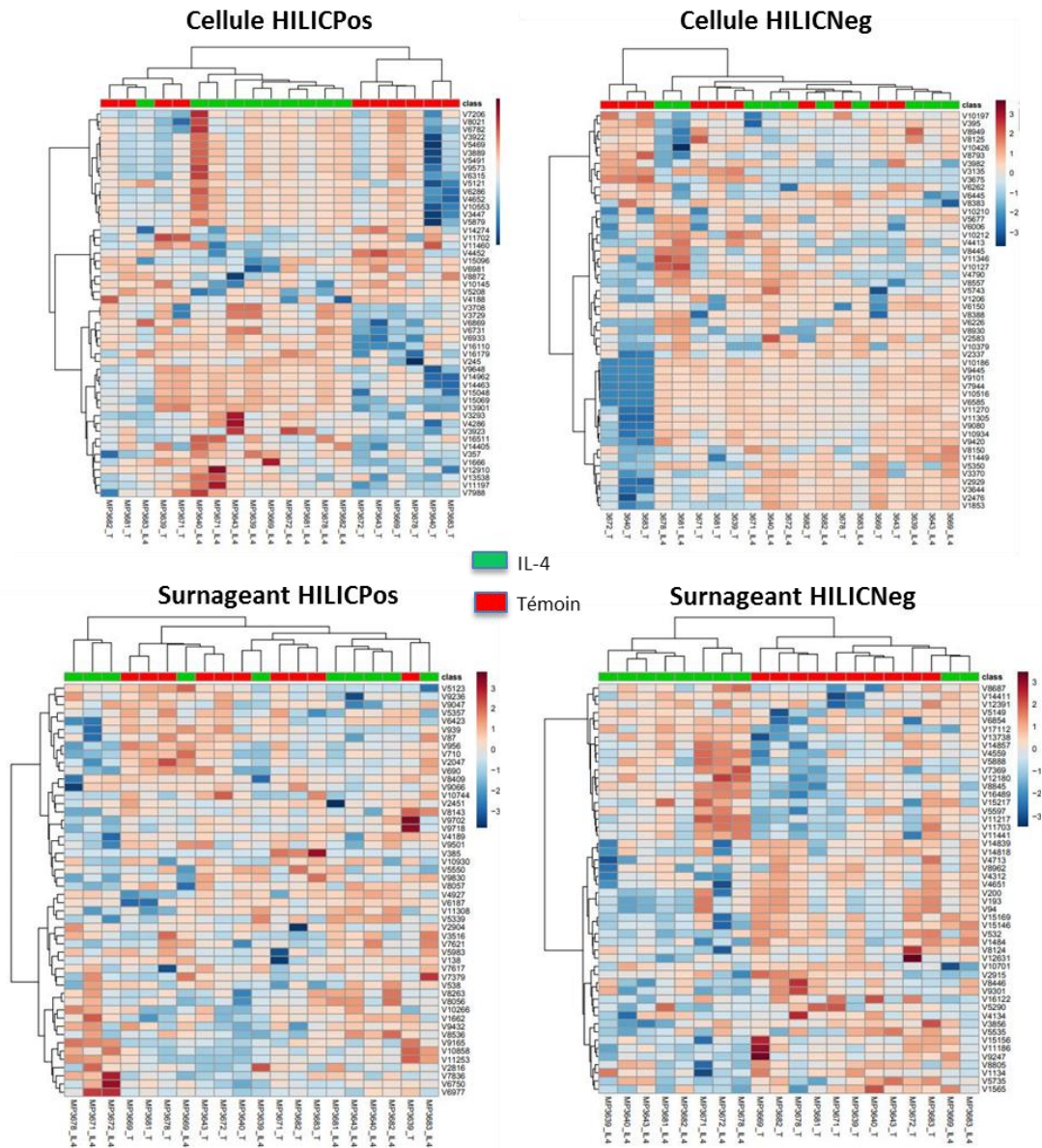


Figure 29 : Classification hiérarchique des groupes étudiés en fonction des variables différenciellement exprimées dans les cellules et surnageants en mode positif et négatif. Chaque colonne représente un échantillon et chaque ligne une variable correspondant à une masse  $m/z$  et Tr. La couleur rouge signifie une augmentation et la couleur bleue une baisse de l'expression de ce métabolite.



Les analyses statistiques multivariées et de prédictions montrent 3 métabolites significatifs pour le contenu intracellulaire et 1 significatif pour le contenu extracellulaire (Tableau 6).

Tableau 6. Variables significatives entre les macrophages pulmonaires humains IL-4 vs Témoins

Variable	m/z	RT	Ionization mode	Chromato	Molecular formula	Putative identity	Level ID	Δppm
<b>Intracellular</b>								
V1890	221.0919	18.5	Pos	HILIC	C11H12N2O3	Hydroxy-tryptophane	3	1
V3417	305.0864	14.81	Pos	HILIC	C10H15O8N3	-	5	3
V3135	384.2460	5.10	Neg	HILIC	C28 H32O	-	5	0.3
<b>Extracellular</b>								
V9811	757.4305	7.69	Pos	HILIC	C10H15O8N3	-	5	3

L'hydroxy-tryptophane est un métabolite appartenant à la voie des kynurénines. C'est le précurseur de la sérotonine qui est un neurotransmetteur régulant l'inflammation et la réparation tissulaire. La concentration de tryptophane baisse en présence de LPS et augmente en présence d'IL-4 passant d'une concentration de 173,2 mg/mL pour les témoins à 50,8 mg/mL (-70%, p=0,0054) pour les macrophages M1 et 179 mg/mL (+3%, p=0,950) pour les macrophages M2. La quantification de l'hydroxy-tryptophane montre une augmentation de 400% (p=0,0416) du métabolite dans les macrophages polarisés M1 et une baisse de 40% (p=0,134) dans les macrophages M2 par rapport aux témoins. La concentration de kynurénine passe de 92,4 ng/mL pour les témoins à 279,5 ng/mL (+202%, p=0,0098) dans les macrophages polarisés M1 et 119 ng/mL (+28%, p=0,4765) dans les macrophages M2.

Après stimulation par l'IL-4, la concentration de tryptophane est inchangée et une baisse de la concentration d'hydroxy-tryptophane non significative par rapport aux macrophages témoins est observée.

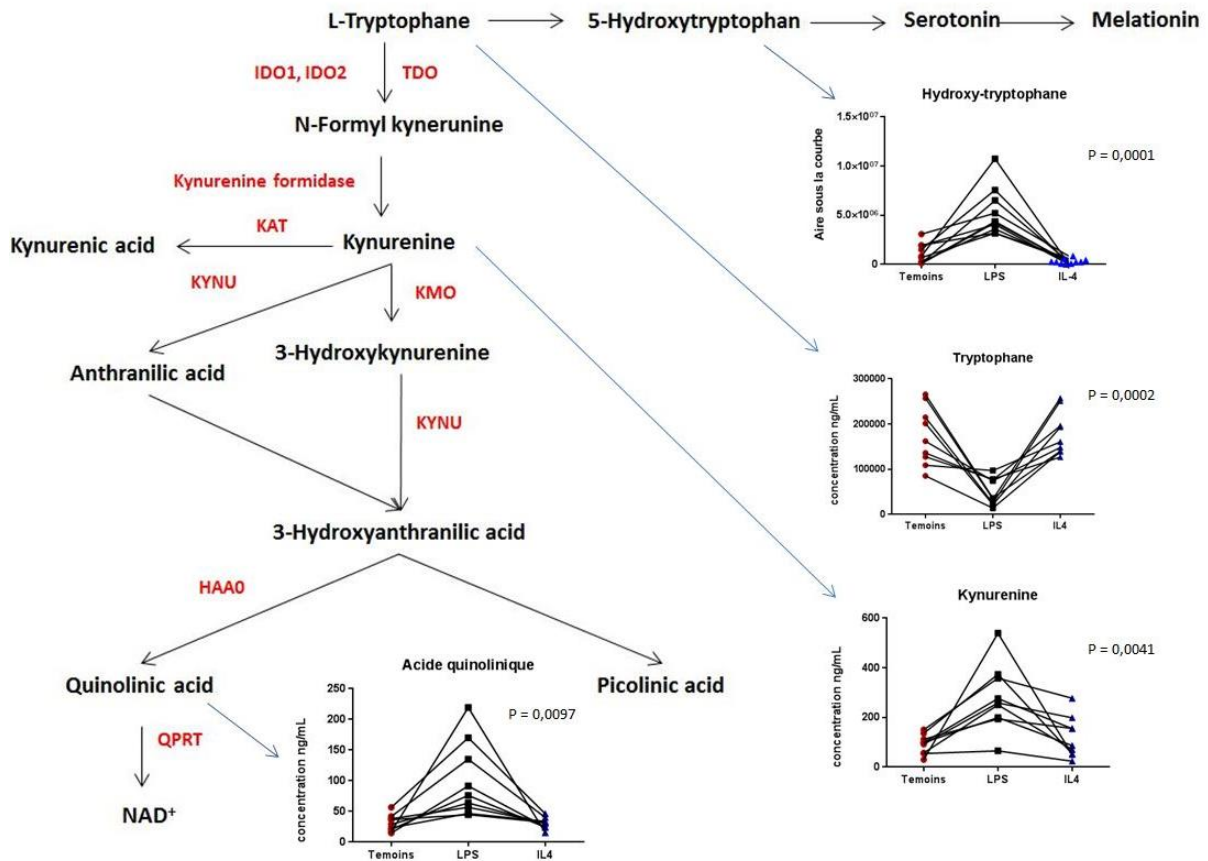


Figure 30 : Quantification des métabolites appartenant à la voie des kynurénines en cas de polarisation M1/M2

Le métabolisme cellulaire des macrophages ne semble pas très affecté par la polarisation M2 par rapport aux macrophages témoins. La voie des kynurénines (l'hydroxytryptophane) est affectée par la polarisation M2 des macrophages mais ce dernier n'induit pas de modification sur les métabolites appartenant au cycle de krebs. Certaines hypothèses pourraient expliquer le petit nombre de métabolites significatifs tels que le temps de culture. Ces résultats seront discutés dans la discussion générale.

## **MODULATION DE LA VOIE DES OXYSTEROLS AU COURS DE** **LA POLARISATION M1/M2 DES MACROPHAGES** **PULMONAIRES**

### **1. INTRODUCTION**

Les interactions entre le métabolisme du cholestérol et le système immunitaire sont médiées par les oxystérols, essentiellement le 25-hydroxycholestérol. Cet oxystérol agit sur le système immunitaire en supprimant la production d'immunoglobulines A (IgA) par les lymphocytes B. Il intervient dans la migration des lymphocytes B activés et dans le contrôle de la différenciation des monocytes en macrophages [140], [157], [260]. Le 25-hydroxycholestérol inhibe la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  dans les BMDM de souris [160] et dans les MDM humains [161]. Il amplifie l'activité des cellules immunitaires et augmente la production des médiateurs immunitaires (IL-6, SCf1 et NOS2) [158].

Dans un modèle de polarisation M1 et M2 de macrophages pulmonaires humains, il a été observé que l'expression des transcrits de 25-hydroxycholesterol était augmentée d'un facteur 12 après traitement par le LPS alors que le traitement par l'IL-4 n'altérait pas l'expression des transcrits (Figure 17) [160], [162].

Des études de quantification d'oxystérols ont été effectuées sur des modèles MDM et sur des modèles murins. Différents niveaux de concentrations sur plusieurs types de matrices ont été trouvés.

L'extraction et l'analyse des oxystérols dans les cellules humaines représentent un grand défi. En effet, ils sont présents en faible quantité dans les systèmes biologiques et le cholestérol s'oxyde facilement à l'air pour donner des oxystérols qui ont les mêmes structures que ceux présent de manière endogène [261]. Beaucoup d'oxystérols sont des isomères de position et sont difficilement différenciables avec certaines techniques d'analyses moléculaires telles que la LC-MS.

Nous avons développé une méthode d'extraction et de quantification ciblée en GC-MS des molécules d'oxystérols et des intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol qui a ensuite été appliquée à l'étude des macrophages polarisés M1 par du LPS et M2 par l'IL-4.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1. Matériels

Le méthanol, le dichlorométhane, l'éthanol et l'hydroxyde de potassium ont été achetés chez Fisher Scientific (Illkirch, France). Le PBS a été acheté chez Eurobio (Ulis, France). Les étalons internes (25-hydroxycholestérol-d<sub>6</sub> utilisé à 10 mg/mL et la prednisolone-d<sub>6</sub> utilisé à 10 mg/mL) ainsi que les 19 molécules analysées ont été achetés chez Bertin technologies (Montigny le Bretonneux, France).

La population de patients utilisée lors de cette étude ciblée sur la voie des oxystérols est représentée dans le tableau suivant :

Tableau 7. Population de macrophages pulmonaires utilisées pour l'analyse ciblée de la voie des oxystérols

N° prélèvement	Nombre de cellules par condition	Sexe	Age	BMI	Statut tabagique	PA	VEMS %
MP 3698	2,86E+06	F	75	21	sevré	30	133
MP 3699	2,88E+06	H	75	20	+	40	70
MP 3700	1,91E+06	F	73				
MP3703	2,45E+06	F	55	20	+		109
MP3705	1,95E+06	H	59	21	+	40	70
MP3707	1,59E+06	H	70	25	+	50	97
MP3708	2,61E+06	H	73	25	sevré		
MP3709	2,80E+06	H	75	27	+	40	59

## 2.2.Méthodes

### 2.2.1. Préparations des échantillons

#### Préparation de la gamme

La gamme a été préparée par des dilutions d'un mélange de 19 molécules dans du méthanol à différentes concentrations listées dans le tableau suivant :

Tableau 8. Préparation de la gamme oxystérols

C° en matrice. Unité :	ng/mL	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Squalène		5	100	500	2500	3500	5000
Cholesterol sulfate		10	100	400	600	800	1000
Oxidosqualène		50	100	400	600	800	1000
Cholesterol		50	1000	10000	50000	150000	200000
Desmosterol		5	100	500	2500	3500	5000
Lanosterol		5	100	400	600	800	1000
Dihydroxycholesterol		1	10	30	60	80	100
24-hydroxycholesterol		1	10	30	60	80	100
25-hydroxycholesterol		1	10	30	60	80	100
27-hydroxycholesterol		1	10	50	100	300	500
7-ketocholesterol		1	50	100	1000	3000	5000
7a-hydroxycholesterol		5	100	500	2500	3500	5000
7b-hydroxycholesterol		5	100	500	2500	3500	5000
7-dehydro-hydroxycholesterol		50	100	400	600	800	1000
Lathosterol		100	1000	2000	3000	4000	5000
Ergosterol		1	10	30	60	80	100
Beta-sitosterol		100	500	1000	4000	7000	10000
Campesterol		10	100	500	1000	5000	10000
Stigmasterol		10	100	500	1000	5000	10000

#### Extraction

Pour l'analyse ciblée des échantillons en GC-MS, nous avons travaillé sur du milieu intracellulaire et extracellulaire. Les échantillons ont été cultivés de la même manière que les cellules pour l'analyse non ciblée en GC-MS. 1 mL de solution a été récupéré dans un mélange ACN/IPA/H<sub>2</sub>O (3/3/2).

À chaque échantillon ou point de gamme, a été ajouté 1 µL de chacun des deux étalons internes (25-hydroxycholestérol-d<sub>6</sub> utilisé à 10 mg/mL et la prednisolone-d<sub>6</sub> utilisé à 10 mg/mL). Ensuite, 3 mL d'un mélange MeOH/dichlorométhane (1/1) sont ajoutés dans tous les échantillons. Ils sont alors purgés sous diazote, vortexés pendant 30 sec, soniqués pendant 30

min, agités par retournement pendant 10 min et centrifugés pendant 10 min à 4000 rpm. La phase organique est ensuite récupérée dans des tubes en verre. À chaque échantillon est ensuite ajouté 300 µL de KOH (5N dans de l'éthanol). Les échantillons sont purgés sous diazote, vortexés et placés dans un bain marie à 35°C pendant 1h30.

Dans chaque échantillon, on ajoute 3 mL de PBS. Ils sont ensuite agités pendant plusieurs secondes. Il s'en suit une centrifugation de 10 min à 4000 rpm à 25°C. La phase organique inférieure est récupérée avec une pipette pasteur dans un tube à hémolyse. Ces derniers sont évaporés à 60°C sous azote, repris dans 50 µL de MSTFA et incubés pendant 60 min à 60°C. Les extraits sont transférés dans des vials avec insert pour injection.

### 2.2.2. Paramètres de spectrométrie de masse

Le même dispositif GC-MS que l'analyse non ciblée a été utilisé. La rampe de température utilisée est : 60°C pendant une minute, 50°C/min jusqu'à 210°C, 20°C/min jusqu'à 290°C, à 8 min on monte à 295°C. A 12 min, la température est augmentée à 320°C par pas de 10°C/min ou elle est maintenue jusqu'à 16,5 min. Le temps d'acquisition total est égal à 16.5 minutes. Nous avons travaillé en impact électronique et les températures pour le spectromètre de masse sont : 280°C pour la ligne de transfert et 250°C pour la source d'ionisation. L'optimisation des transitions de masse en GC-MS/MS se déroule en 4 parties. Les ions sont injectés en « full scan » et les transitions majoritaires choisies pour chacun molécule. Ensuite les ions parents sont fragmentés pour obtenir un ensemble d'ions fils. Les ions fils ou ions produits majoritaires sont sélectionnés et la GC optimise pour chaque transition une énergie de collision optimale. Voici la liste des molécules analysés avec les différents paramètres et énergies de collision utilisés (Tableau 9).

### 2.2.3. Analyse des données

Les analyses ont été réalisées par le logiciel Xcalibur v 3.0.63 (ThermoFisher) qui a permis l'intégration des pics chromatographiques d'intérêt. Chaque représentation graphique et tous les tests statistiques (analyses de variance et t-test) ont été réalisés par le logiciel GraphPad Prism 5.0.

Les résultats ont été exprimés en moyenne ± SEM. Des tests statistiques non paramétriques ont été réalisés et la normalité des échantillons évaluée. Les résultats furent considérés significatifs pour une valeur  $p < 0,05$ .

Tableau 9. Liste de molécules analysées avec les différents paramètres et énergies de collision

Nom	Tr	Masse parent	Masse ion produits	Energie collision
Squalene	9.86	121.1	93	10
Squalene	9.86	136.2	121	10
Oxidosqualene	10.72	143.2	73	10
7-ketocholesterol	11.23	454.4	233	35
7- $\alpha$ -hydroxycholesterol	11.32	456.4	209	30
7- $\alpha$ -hydroxycholesterol	11.32	456.4	233	35
Cholesterol	11.64	353.4	199	30
Cholesterol	11.64	368.4	255.2	5
Cholesterol	11.64	368.4	353.2	5
7-dehydro-hydroxycholesterol	11.81	325.3	119.1	40
7-dehydro-hydroxycholesterol	11.81	351.4	145	35
Desmosterol	11.83	343.3	147	45
Desmosterol	11.83	343.3	253.2	5
Desmosterol	11.83	441.4	351.2	5
Lathosterol	11.91	458.4	213	30
Lathosterol	11.91	458.4	229.1	15
7- $\beta$ -hydroxycholesterol	11.99	456.4	209	30
7- $\beta$ -hydroxycholesterol	11.99	456.4	233	35
Ergosterol	12.03	363.4	143	45
Ergosterol	12.03	468.4	363.1	20
Campesterol	12.18	343.3	95.1	35
Campesterol	12.18	343.3	121.1	30
Campesterol	12.18	382.4	255.1	5
Stigmasterol	12.33	255.2	159	15
Stigmasterol	12.33	394.3	255.1	5
Stigmasterol	12.33	484.4	394.2	5
$\beta$ -sitosterol	12.69	129.1	73	10
$\beta$ -sitosterol	12.69	357.4	121.1	25
$\beta$ -sitosterol	12.69	486.4	396.3	5
lanosterol	12.74	483.3	392.9	5
Lanosterol	12.74	498	393.1	25
7,25-dihydroxycholesterol	12.84	544.5	209.2	40
7,25-dihydroxycholesterol	12.84	544.5	233.1	50
24-hydroxycholesterol	13.08	413.4	159.1	15
24-hydroxycholesterol	13.08	413.4	323.2	5
25-hydroxycholesterol-d <sub>6</sub>	13.15	137.1	73	10
25-hydroxycholesterol-d <sub>6</sub>	13.15	271.3	95	25
25-hydroxycholesterol	13.22	456.4	213.1	35
25-hydroxycholesterol	13.22	456.4	255.1	5
25-hydroxycholesterol	13.22	456.4	441.1	30
27-hydroxycholesterol	13.66	456.4	160.1	25
27-hydroxycholesterol	13.66	456.4	213.1	35
27-hydroxycholesterol	13.66	456.4	255.1	5

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. Optimisation de la procédure d'extraction

Les plastiques sont incompatibles avec les stérols car ces derniers sont absorbés. Pour cette raison, l'utilisation de plastique à chaque étape du processus d'extraction a été réduite au minimum [236], [262].

Dans le but d'améliorer la détection en optimisant la dégradation de la membrane cytoplasmique des macrophages, quatre mélanges de détergents ont été testés et comparés entre eux lors de la préparation d'échantillon : tween/triton, tween/CHAPS, tween/SDS et tween/SDS/triton/CHAPS à des concentrations finales égales à 4% (m/m) pour le CHAPS, 1% pour le tween et le Triton et 0,5% pour le SDS. Ces derniers ont aussi été comparés à un témoin sans détergent. Les résultats montrent que l'utilisation de détergent ne permettait pas d'améliorer la procédure d'extraction.

Les oxystérols formés par voie enzymatique sont généralement estérifiés entre 59 % et 91 % [263]. Dans le but de quantifier les stérols libres et de minimiser leurs états d'oxydation, des réactions de saponification ont été effectuées lors du développement de la méthode. Trois préparations de KOH solubilisé dans de l'éthanol ont été testées : 1N, 5N et 10N ainsi que l'hydroxytoluène butylé (BHT) qui est un antioxydant [263]. Il est apparu que l'ajout de KOH à 5N dans de l'éthanol dans les échantillons hydrolysait efficacement les esters stériques en stérols libres et améliorait la détection des molécules. L'ajout de BHT n'améliore pas le rendement de détection.

L'extraction sur phase solide (SPE) permet d'améliorer le rendement de détection des molécules faiblement présentes en concentrant et en filtrant certains composés que nous ne souhaitons pas analyser. Des colonnes de SPE « Isolute NH<sub>2</sub> » utilisées pour l'extraction des composés fortement acides (contenant des groupements sulfoniques) ont été testées. Le principe de séparation se base sur un échange anionique faible. Dans notre modèle d'extraction, la SPE n'a pas permis d'améliorer la détection de nos molécules d'intérêt.



### 3.2.Résultat de la quantification

Sur les 18 molécules dosées, seules 13 ont été quantifiables. Les molécules ont été dosées dans le contenu intracellulaire. 7 des molécules quantifiées n'ont pas pu être mesurées car leurs concentrations étaient inférieures à leurs limites de quantification. Les moyennes des 13 molécules  $\pm$  SEM sont les suivantes :

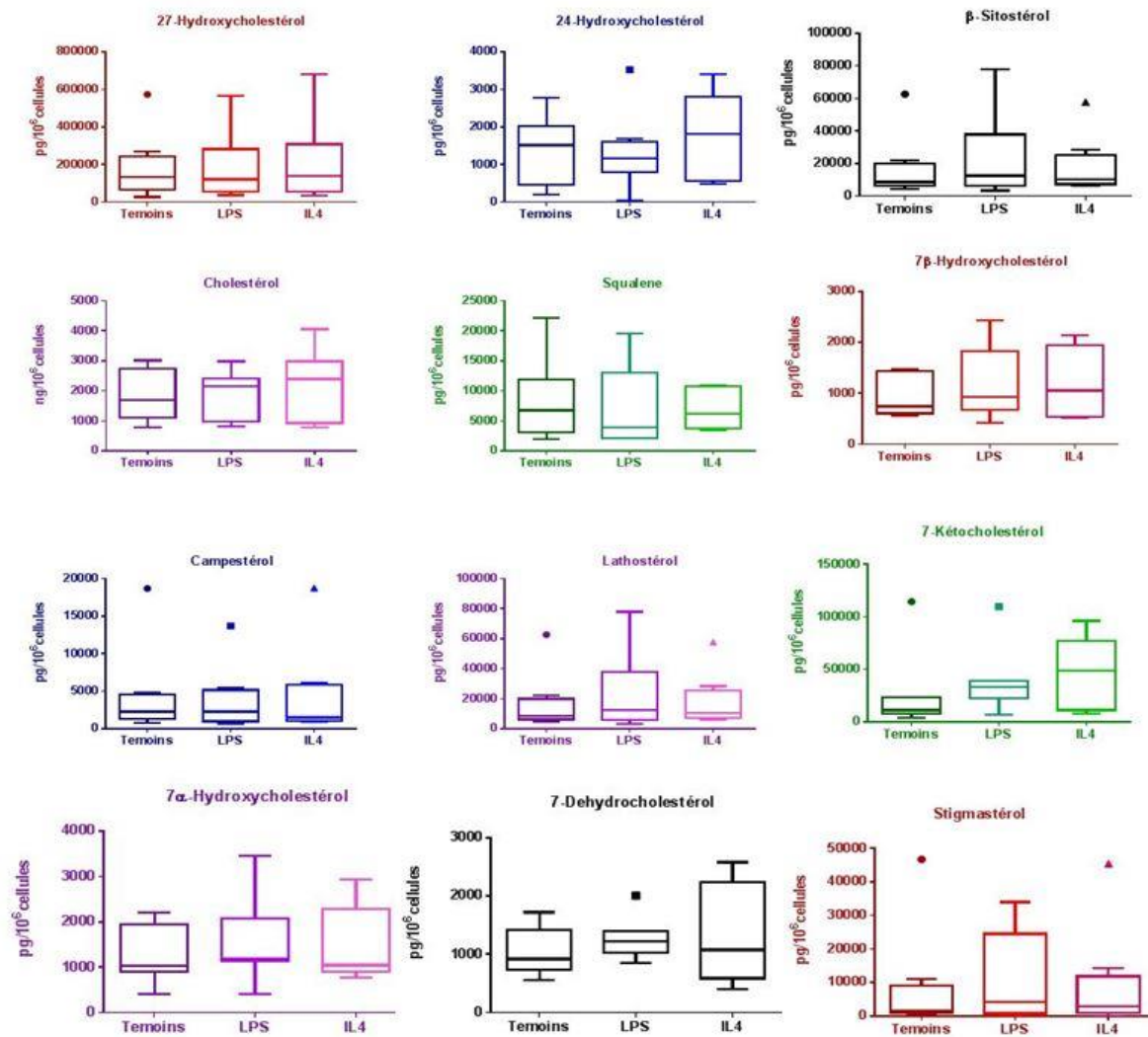
Tableau 10 : Quantification des oxystérols en GC-MS dans du contenu intracellulaire (n=8)

	Témoins	LPS	IL-4
	Moyenne $\pm$ SEM		
Cholestérol (ng/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	1823 $\pm$ 302	1854 $\pm$ 286	2174 $\pm$ 418
Stigmastérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	8395 $\pm$ 5609	10801 $\pm$ 4718	9023 $\pm$ 5441
27-hydroxycholestérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	178858 $\pm$ 62363	181733 $\pm$ 63588	208571 $\pm$ 76149
24-hydroxycholestérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	1368 $\pm$ 321	1322 $\pm$ 360	1780 $\pm$ 416
25-hydroxycholestérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	20906 $\pm$ 4785	19524 $\pm$ 4284	26222 $\pm$ 6786
Squalène (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	8275 $\pm$ 2945	7090 $\pm$ 2835	6903 $\pm$ 1334
Campesterol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	4471 $\pm$ 2086	3856 $\pm$ 1522	4530 $\pm$ 2151
Lathostérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	16586 $\pm$ 6881	23281 $\pm$ 9012	18104 $\pm$ 6211
$\beta$ -sitostérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	16586 $\pm$ 6881	23281 $\pm$ 9012	18104 $\pm$ 6211
7 $\alpha$ -hydroxycholestérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	1299 $\pm$ 242,4	1533 $\pm$ 370	1506 $\pm$ 309
7 $\beta$ -hydroxycholestérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	968 $\pm$ 150	1147 $\pm$ 272	1183 $\pm$ 254
7-dehydroxycholestérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	1041 $\pm$ 153	1274 $\pm$ 140	1302 $\pm$ 317
7-ketocholestérol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	26646 $\pm$ 14825	38512 $\pm$ 12563	51509 $\pm$ 12660
Oxidosqualene (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	ND	ND	ND
Desmosterol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	ND	ND	ND
Ergosterol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	ND	ND	ND
Lanosterol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	ND	ND	ND
Dihydroxycholesterol (pg/10 <sup>6</sup> $\mathcal{C}$ )	ND	ND	ND

ND : non déterminé

Ci-dessous une représentation en boîte à moustache ou box-plot des données. Ce graphique permet de résumer les données de manière simple et visuelle, d'identifier les valeurs extrêmes et de comprendre la répartition des observations. La valeur centrale du graphique est la médiane. Les bords du rectangle représentent les quartiles. La médiane est alors indiquée par la barre centrale et le 1er et 3ème quartile délimite la partie inférieure et supérieure de la

boîte. 50% des données milieu sont délimitées par cette boîte. 25% (un quart) lui sont inférieures et 25% supérieures. Les points en dehors du graphe sont des données extrêmes.



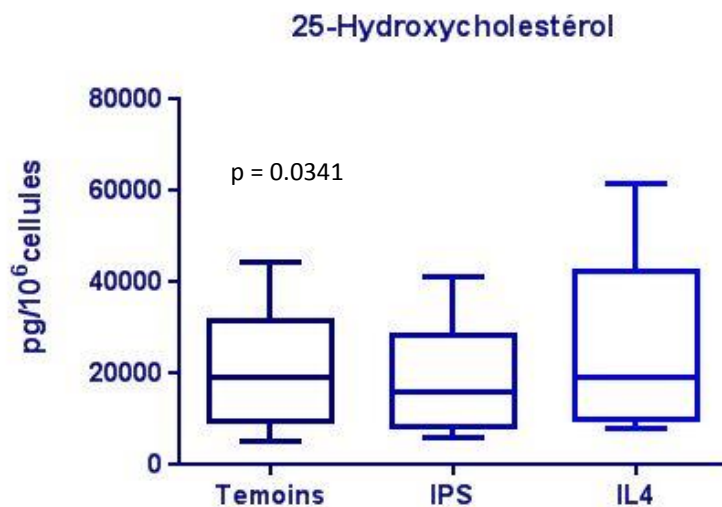


Figure 31 : Expression des oxystérols et des stérols dans les macrophages pulmonaires humains polarisés n=8, les résultats sont représentés sous forme de boîte à moustache. Les statistiques ont été effectuées par la méthode ANOVA suivie d'un test t\* indique une différence significative avec le témoin (\*p<0.05).

Nos dosages n'ont pas montré de différence significative pour les 13 molécules dans les trois conditions de cultures. La concentration de 25-hydroxycholesterol passe d'une quantité égale à  $20906 \pm 4785$  pg/10<sup>6</sup> à  $19524 \pm 4284$  pg/10<sup>6</sup> dans les macrophages stimulés par LPS et  $26222 \pm 6786$  pg/10<sup>6</sup> dans la population stimulée par IL-4. Les transcrits de l'enzyme 25-hydroxycholesterolase étaient augmentées d'un facteur 12 dans les macrophages pulmonaires humains après traitement par le LPS comme décrit dans les études portant sur les macrophages murins [160], [162], alors que le traitement par l'IL-4 n'altérait pas l'expression des transcrits dans les travaux de l'UPRES EA220. Cette variation n'est pas retrouvée au niveau de la molécule de 25-hydroxycholesterol.

Lin *et al* ont travaillé sur des macrophages de souris et d'humains. Ils ont quantifiés les oxystérols présents dans les macrophages péritonéaux murins et dans du plasma chez les échantillons humains en LC-MS et utilisent la SPE N,N-diméthylglycinate (DMG) pour augmenter la sensibilité. Les concentrations des oxystérols testés (7-ketocholesterol, 4β-hydroxycholesterol) varient de 25 à 50 μg/mL [264].

Differentes méthodes de préparation d'échantillons et de detection sont testés dans l'objectif d'améliorer l'analyse des oxystérols [261], [264], [265]. Crick *et al* ont effectués leurs

développements analytiques dans des échantillons de plasma [265]. Des méthodes de LC-MS avec et sans dérivation sont également développées et testées pour améliorer la détection des oxystérols.

De grandes disparités dans les concentrations d'oxystérols sont observées dans une même matrice avec différentes méthodes de spectrométrie de masse : LC-MS ou GC-MS. Pour le plasma par exemple, on retrouve une grande variation des concentrations répertoriées par Griffiths *et al* [261]. Dans ces travaux, nous pouvons voir que le 25-hydroxycholestérol dosé varie entre 0,82 ng/mL et 6,96 ng/mL en GC-MS et entre 14 et 31 ng/mL en LC-MS dans du plasma. Les concentrations de 24-hydroxycholestérol varient entre 33,1 ng/mL et 55 ng/mL en GC-MS et entre 8 ng/mL et 64 ng/mL. Les concentrations d'autres oxystérols tels que le 7 $\alpha$ -hydroxycholestérol, le 7 $\beta$ -hydroxycholestérol ou le 7-dehydroxycholestérol y sont listées [261].

Mutemberezi *et al* ont étudié la cinétique de sécrétion de certains oxystérols dans une lignée cellulaire microgiales murines après stimulation avec du LPS et de l'IL-4 en LC-MS [266].

Dans leurs travaux, la concentration de 25-hydroxycholestérol baisse de façon significative en présence de LPS et augmente de manière non significative en présence d'IL-4. Les concentrations sont quantifiées à quatre temps différents pour le LPS (4, 8, 16 et 24 h) et à deux temps (12 et 24h) en présence d'IL-4. En présence de LPS, au bout de 4h la concentration de 25-hydroxycholestérol commence à baisser par rapport aux témoins et cette baisse continue jusqu'à 24h. Les résultats de la quantification des macrophages pulmonaires humains suggèrent une légère diminution du 25-hydroxycholestérol entre les témoins et les LPS au bout de 24h de culture, qui cependant n'atteint pas le seuil de significativité statistique. Pour l'IL-4, ils observent une légère augmentation de la concentration de 25-hydroxycholestérol au bout de 24h d'incubation. Nous avons aussi observé cette petite augmentation de la concentration de 25-hydroxycholestérol au bout de 24h d'incubation des cellules [266].

Nous pouvons aussi noter que les études transcriptomiques ne sont pas toujours le reflet exact de l'activité des métabolites dans la cellule. Plusieurs types de modifications post-transcriptionnelles peuvent être à l'origine de cette différence. Nos dosages ont été faits sur un petit effectifs (n=8), et il serait intéressant de doser les oxystérols sur une grande cohorte. Les boîtes à moustache nous montrent aussi une grande variabilité inter-individus sur les concentrations mesurées.



## DISCUSSION GÉNÉRALE

La polarisation des macrophages fait l'objet de recherches intensives dans les MDM ou dans les modèles murins, cependant les modifications du métabolisme cellulaire au cours la polarisation des macrophages pulmonaires humains n'ont jamais été explorées. Il a été démontré un comportement différentiel des macrophages en fonction du tissu et de l'environnement dans lequel ils se trouvent [166]. Des altérations métaboliques de la voie du glucose, du cycle de krebs, de la voie des pentoses phosphates, de la  $\beta$ -oxydation ainsi qu'un ensemble d'autres voies ont été observées dans ces différents modèles [80], [93], [100], [102], [103], [115].

Dans ce dernier chapitre, nous allons résumer et discuter l'ensemble des travaux effectués lors de cette thèse. Nos travaux nous ont permis d'approfondir nos connaissances sur les métabolites exprimés sur les deux phénotypes dans le but de mieux appréhender la réaction inflammatoire des macrophages pulmonaires. Des méthodes de traitements d'échantillons, d'analyses par spectrométrie de masse ainsi que de retraitement de données ont été développées pour analyser le métabolome des macrophages polarisés M1 et M2. Pour y arriver, nous avons découpé notre discussion en deux axes : 1) aspects analytiques de l'analyse métabolomique ciblée et non ciblée sur les macrophages pulmonaires humains 2) biologie des macrophages pulmonaires humains polarisés *in vitro* avec du LPS et de l'IL-4.

## I. Population de l'étude et préparation des échantillons

L'étude métabolomique non ciblée des macrophages pulmonaires humains a été réalisée sur 10 patients, l'étude ciblée sur la voie des oxystérols sur 8 patients et la quantification ciblée des métabolites sur 5 patients. La population de patients utilisée dans nos travaux souffrait de cancer pulmonaire et devait subir une chirurgie. Il pourrait alors y avoir des altérations sous-jacentes liées au cancer. Les patients utilisés avaient des modes de vie différents. 44% de la population étudiée étaient fumeurs au moment de l'opération, 48% d'anciens fumeurs (sevrés), 4% des non-fumeurs et le statut tabagique des 4% restant était inconnu. 8 % des patients ont eu une BPCO post tabac. Certaines pathologies pulmonaires ont une grande influence sur la polarisation des macrophages d'où l'importance d'avoir un maximum d'information sur les patients. En faisant le profilage transcriptionnel des BAL de macrophages de non-fumeurs sains, de fumeurs sains et de fumeurs atteints de BPCO Shaykhiev *et al* ont montré l'influence du tabagisme sur la polarisation des macrophages [67]. Le statut tabagique influence la polarisation des macrophages vers un profil M2.

L'étude métabolomique non ciblée a été réalisée sur 10 patients en raison de la rareté du tissu étudié. Ces patients ont été rassemblés sur une durée d'une année maximum. Ceci suggère que certains échantillons ont été conservés entre 6 à 12 mois à -80°C avant de procéder à l'analyse. Les stabilités des métabolites n'étant pas toutes connues, cette procédure pourrait avoir des incidences sur nos résultats. Haid *et al* ont montré que la conservation des échantillons impacte la concentration des métabolites [267].

## II. Aspects analytiques

Cette première partie nous a permis d'optimiser les paramètres analytiques pour couvrir une large partie du métabolome humain. Les métabolites présentent une grande différence au niveau des propriétés physico-chimiques (hydrophilie/hydrophobie, volatilité, réactivité/stabilité chimique). Nous nous sommes donc appliqués à améliorer tout le processus analytique et de traitement de données. Boudah *et al* avaient déjà mis en évidence l'intérêt de l'utilisation de plusieurs types de colonnes chromatographiques [215] d'où l'utilisation des colonnes HILIC et RP en modes positif et négatif. Combiner l'analyse GC-MS et LC-MS s'est aussi avéré bénéfique car de nombreuses publications suggèrent que les deux méthodes sont complémentaires [215], [268], [269].

Pour cette première partie des travaux, nous avons travaillé exclusivement avec la colonne HILIC connue pour offrir une large couverture du métabolome sérique [215].

L'optimisation des paramètres d'acquisition a permis d'améliorer considérablement le signal en favorisant la détection de métabolites et en minimisant les interférences ainsi que le bruit de fond. Le mode « full scan » avec un seul segment de masse est utilisé dans le domaine de la métabolomique actuel. Cependant, notre méthode améliore la détection en permettant de voir un plus grand nombre de métabolites et de façon robuste. Les interférences en LC-MS dans nos conditions analytiques représentaient jusqu'à 86 % de l'intensité totale du signal dans le plasma humain et dans des échantillons de solvant. Les interférences peuvent être laboratoire-dépendantes, solvant-dépendantes ou matrice-dépendantes. Notre hypothèse initiale était qu'enlever les interférences permettrait d'améliorer la détection. Celle-ci s'est avérée correcte, cependant nous avons également observé qu'un découpage en 3 segments de masse équivalent présentait plus d'avantage. En effet, cette dernière méthode a permis d'augmenter le nombre de signaux totaux, le nombre de pics après application des filtres de robustesse ainsi que le nombre de pics prédictivement annotés par les bases de données qui couvrent le métabolome humain.

Dans le tableau ci-dessous, une comparaison de notre méthode avec des méthodes de métabolomiques publiées sur du plasma humain. La grande différence entre notre méthode et les méthodes indexées dans ce tableau est la gamme d'acquisition. En utilisant le même système chromatographique et le même spectromètre de masse, en comparaison avec Contrepolis par exemple, la détection est considérablement améliorée.



Tableau 11 : Tableau comparatif des résultats de quelques méthodes analysant le métabolome plasmatique chez l'homme par LC-MS

Méthodes références	Prise d'essai (µL)	Préparations échantillons	LC	MS Mode positif	Nombres de métabolites détectés
Fall <i>et al</i> (Accepté)	100	LLE	Zic-HILIC 40 mn 40°C	Orbitrap (60-300; 300-600; 600-900) <i>m/z</i>	11005
Contrepois <i>et al</i> [216]	100	LLE	Zic-HILIC 15 mn 40°C	Orbitrap (50-1000) <i>m/z</i>	2956
Housley <i>et al</i> [270]	20	LLE	RP : Inertsil Ph-3 47 mn 50°C	TripleTOF 5600 (70-1250) <i>m/z</i>	470
Jové <i>et al</i> [271]	100	LLE	RP C <sub>18</sub> Zorbax 24 mn 60°C	Q-TOF (100-3000) <i>m/z</i>	1269
Zhou <i>et al</i> [272]	80	LLE	RP BEH C <sub>18</sub> 15 mn 45°C	TripleTOF (70-1000) <i>m/z</i>	7959

Pour analyser nos échantillons de macrophages pulmonaires humains, nous avons travaillé avec les deux modes d'ionisation disponibles en LC-MS sur la source d'ion ESI. Des études portant sur l'importance de faire des analyses en modes positif et négatif en LC-MS ont été effectuées pour les analyses métabolomiques. Certaines familles de molécules sont connues pour être plus sensible à une méthode d'ionisation, par exemple les amines de types RNH<sub>2</sub> sont ionisées en mode positif en RHN<sub>3</sub><sup>+</sup>. En revanche, les acides sont plus sensibles à l'ionisation en mode négatif (RCOOH donne RCOO<sup>-</sup>). Les deux modes peuvent apporter une information similaire mais aussi des informations spécifiques d'où l'intérêt d'analyser nos échantillons avec les deux modes d'ionisation en LC-MS. Dans nos résultats d'analyse non ciblée des macrophages pulmonaires humains, lorsque nous combinons les résultats du milieu intracellulaire et du milieu extracellulaire, l'HILIC positif donne 27999 signaux dont 3775 métabolites après application des filtres de robustesse. L'analyse en HILIC en mode négatif donne 29821 signaux dont 5647 métabolites. Les statistiques révèlent 12 métabolites significatifs en HILIC en mode positif contre 22 métabolites en HILIC en mode négatif. Nous voyons alors que le mode négatif, dans nos analyses, nous apporte une plus grande information en terme de détection que le mode positif. La même situation est observée avec la

colonne RP. Il est donc important d'analyser les échantillons avec les deux modes d'ionisation au vu de la polarité très variable dans les familles de molécules.

En plus des différentes méthodes d'ionisation, nous avons utilisés deux types de colonne chromatographiques dans le but de couvrir un large spectre de molécules. L'état de l'art sur le métabolisme des macrophages montre que plusieurs voies métaboliques ayant des propriétés physico-chimiques différentes sont altérées au cours de la polarisation. En effet, le métabolisme lipidique, la glycolyse et d'autres molécules ayant une polarité différente étaient modifiés en fonction du phénotype. Ces observations ont conforté notre volonté de tester deux types de colonne chromatographique qui diffèrent essentiellement par leur pouvoir de rétention basé sur la polarité des molécules. Dans nos jeux de données sur les macrophages pulmonaires humains, la colonne HILIC permet de détecter 9422 métabolites dont 34 statistiquement significatifs contre 3208 dont 4 statistiquement significatifs pour la colonne RP. La colonne HILIC est connue pour analyser les métabolites polaires. Elle nous a permis de détecter un ensemble de métabolites appartenant au métabolisme lipidique non détectés en RP comme les métabolites appartenant à la voie de l'acide arachidonique dans nos macrophages pulmonaires humains polarisés M1 ou M2. Cependant, le métabolome humain contient un ensemble de molécules très polaires constituant ainsi une limite pour la colonne HILIC.

L'utilisation de la HILIC et de la RP en mode positif et négatif sur nos échantillons a permis la détection de milliers de signaux. 85% des signaux ont été exclus de l'analyse en se basant sur les filtres analytiques de robustesse. Seuls les 13097 pics restant étaient considérés comme des métabolites. Un panel de tests statistiques effectué sur ces métabolites a révélé 40 statistiquement significatifs. En métabolomique non ciblée, il est courant de trouver des milliers de pics après la détection (XCMS) mais au maximum, seul 1/10 sont considérés comme des métabolites et conservés à la fin de l'analyse [247]. Après la détection par XCMS, les pics trouvés ne peuvent pas tous être considérés comme des vrais pics chromatographiques. Un bon nombre d'entre eux sont des contaminants, des artefacts, des adduits et isotopes de molécules déjà listées. Nous avons appliqués à nos données un ensemble de filtres sur l'intensité, le temps de rétention et la reproductibilité, basés sur les échantillons de contrôle qualité et les blancs pour filtrer au maximum les données et avoir des pics chromatographiques intenses et robustes. Les tables de données issues des analyses métabolomiques non ciblées sont souvent exploitées de façon ciblée pour des métabolites spécifiques ayant des temps de rétention et des schémas de fragmentation connus. Une autre

approche, qui est la notre, consiste à se concentrer sur les petits sous-ensembles de pics statistiquement significatifs entre les classes d'échantillons [273]. Une bonne partie des pics issues des analyses métabolomiques n'est pas exploitée car leurs masses et leurs schémas de fragmentation ne correspondent à aucun métabolite présent dans les bases de données.

La métabolomique non ciblée est aujourd'hui un outil très intéressant pour la détection de nouveaux biomarqueurs d'intérêt mais elle présente plusieurs limites. Les méthodes de dosages non ciblées permettent de comparer les métabolites présents dans différents échantillons à des états physiologiques variés. Dans notre étude, on détecte une grande différence entre le nombre de pics détectés et le nombre de pics significatifs. La variabilité physico-chimique des métabolites, la non spécificité et le manque de sensibilité des méthodes d'analyses non ciblées peuvent entraîner une faible détection de certains métabolites présents à des concentrations minimales. L'état des connaissances actuelles sur la métabolomique des macrophages montre plusieurs voies métaboliques altérées par la polarisation M1/M2 par rapport aux macrophages témoins. Notre approche non ciblée a mis en évidence trois voies altérées : le cycle de Krebs, la voie des kynurénines et la voie de l'acide arachidonique. Il est important de noter que ce n'est pas parce qu'une voie métabolomique n'est pas identifiée lors de l'analyse non ciblée qu'elle n'est pas modulée sous l'effet de la polarisation.

Les techniques d'analyses non ciblées présentent un vrai problème de robustesse. En effet, il est impossible à ce jour de standardiser ce type d'approche et aucune validation conventionnelle n'est proposée par les utilisateurs. Les analyses sont réalisées avec des systèmes différents, des techniques d'acquisition différentes et des modes de préparation d'échantillons différents. La combinaison de la métabolomique non ciblée à d'autres approches « omiques » tels que la transcriptomique, comme effectué sur la voie des kynurénines, s'est avéré intéressante et complémentaire.

L'approche ciblée sur certaines familles de molécules est très complémentaire de l'analyse non ciblée car elle offre une meilleure sélectivité, robustesse et sensibilité de détection pour les molécules d'intérêt. Cette approche permet d'adapter les conditions chromatographiques, de mieux standardiser l'analyse et elle offre la possibilité d'utiliser des étalons internes enrichis en isotopes stables adaptés à la famille de molécules que l'on souhaite prioriser dans l'analyse. Cependant, malgré tous les avantages, c'est une approche qui offre une couverture limitée du métabolome. Il serait intéressant de développer un ensemble de méthodes ciblées sur les voies altérées par la polarisation dans les MDMs ou d'autres modèles cellulaires (voie de la glycolyse, métabolisme de l'oxygène, voie de l'arginine, cycle de krebs) pour les étudier

dans les macrophages pulmonaires humains. On pourrait considérer que certaines molécules sont présentes à des concentrations inférieures à leur limite de détection et ne sont donc pas détectables lors de l'analyse non ciblée.

Les mêmes échantillons ont été analysés en GC-MS et en LC-MS. La LC-MS nous a permis de détecter un plus grand nombre de molécules car elle couvre une gamme de molécules plus variées chimiquement. Au total, avec toutes les colonnes chromatographiques et modes d'ionisation, elle nous a permis de détecter 12630 métabolites dont 38 sont significatifs. La GC-MS détecte 467 pics dont 2 significatifs. La LC-MS apporte une information plus importante sur le métabolisme cellulaire, cependant elle nécessite beaucoup plus de préparation d'échantillons, de temps d'analyse et de traitement de données. Les résultats issus de la GC-MS sont plus faciles à retraiter que ceux de la LC-MS. En effet les problèmes de dérive analytique se posent moins en GC-MS par rapport à la LC-MS. L'annotation des métabolites est aussi beaucoup plus simple et fiable en GC-MS. Les bases de données sont bien renseignées sachant qu'avec une même énergie de collision, les schémas de fragmentation des molécules restent les mêmes. Les deux molécules détectées en GC-MS sont des acides (acide quinolinique et acide malique). Ces derniers n'ont pas été identifiées lors de l'analyse non ciblée par LC-MS. Cependant, la combinaison des deux méthodes est très bénéfique car elle nous a permis de mettre en lumière certaines familles de molécules. Par exemple, en GC-MS nous avons identifié l'acide quinolinique ce qui nous a poussé à développer des méthodes d'analyses ciblées en LC-MS pour quantifier les métabolites appartenant à cette voie. Toutes les comparaisons effectuées entre notre méthode et des méthodes publiées [196] nous confirment l'avantage d'utiliser notre nouvelle méthode de détection de métabolites transposables à différents types d'études métabolomiques.

Nos expériences ont montré que l'amélioration de la détection n'était pas liée à l'exclusion des interférences, mais plutôt à la segmentation en trois gammes de masse. Le risque potentiel de cette stratégie est que chaque masse individuelle soit acquise à une fréquence 3 fois inférieure, ce qui aurait pu entraîner la non-détection de certains pics. Cependant, dans nos conditions expérimentales, ce point n'a pas eu d'impact significatif sur la détection des métabolites

Les principes fondamentaux de la spectrométrie de masse qui sous-tendent cette observation s'appliquent bien entendu qu'aux instruments fonctionnant avec les mêmes technologies que l'Orbitrap. Une comparaison avec d'autres spectromètres de masse, dont le TOF, serait intéressante et pourrait faire l'objet de travaux complémentaires.

Les outils analytiques qui existent pour le traitement informatique des données métabolomiques sont faits pour être utilisés sur une seule gamme de masse. De ce fait, il a été nécessaire de redéfinir et de développer de nouveaux scripts informatiques pour le retraitement de nos données avec le soutien du commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA, E. Thévenot et N. Lennuza).

Tout d'abord, une segmentation informatique a été effectuée pour voir si la coupure en différentes gammes de masse n'allait pas engendrer une perte de signal. Des échantillons acquis en « full scan » avec un seul segment de masse ont été informatiquement coupés en 3 gammes de masse pour les comparer aux mêmes échantillons acquis avec 3 segments de masse sur le spectromètre. Les résultats ont montré que la segmentation n'altérait pas les performances de la détection. Dans un second temps, pour analyser les données, des scripts ont été développés pour prendre en compte la segmentation avec XCMS. Cette étape de l'analyse a demandé un temps très long de travail informatique.

### III. Biologie des macrophages

L'utilisation de toute cette méthodologie pour les analyses non ciblée et ciblée sur les macrophages pulmonaires humains a permis de mettre en évidence quatre voies métaboliques :

- La voie de l'acide arachidonique
- La voie des kynurénines
- Le cycle de Krebs
- Les oxystérols

L'acide arachidonique et ses métabolites ont suscité un grand intérêt pour la biologie de l'inflammation ou du cancer pulmonaire. La voie de l'acide arachidonique a été étudiée et décrite par l'UPRES EA220 ainsi que dans d'autres travaux via des études transcriptomiques [274]–[276]. Cette étude a révélé une surexpression d'enzymes comme la prostaglandine E synthase (PGTES), la phospholipase A2 (PLA2) et une sous-expression d'enzymes comme la leucotriène A4 hydrolase (LTA4H) et le « *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* » (PPAR $\gamma$ ) par le LPS.

La voie de l'acide arachidonique, faisant partie du métabolisme lipidique, est altérée dans les macrophages pulmonaires humains lors de la polarisation M1. Nos résultats montrent une régulation différentielle des métabolites de cette voie. Cette voie de l'acide arachidonique est bien décrite dans la littérature, nous n'avons donc pas développé de méthode d'analyse ciblée sur cette voie. Les leucotriènes (LT) et les prostaglandines (PG) sont impliqués dans les cascades de réactions inflammatoires qui se produisent dans les voies respiratoires asthmatiques. Il a été démontré que la prostaglandine D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) et les thromboxanes A<sub>2</sub> sont des bronchoconstricteurs, les PGE<sub>2</sub> et la prostacycline sont des bronchoprotecteurs et les LT sont exclusivement pro-inflammatoires. Les cystéinyl leucotriènes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>) produisent des effets caractéristiques de l'asthme, comme une bronchoconstriction puissante, une perméabilité accrue de la membrane endothéliale entraînant un œdème des voies respiratoires et une sécrétion accrue de mucus épais et visqueux [277]. L'utilisation d'antileucotriènes a permis de réduire les symptômes cliniques liés à l'asthme [277].

En outre, les eicosanoïdes ont été identifiés comme des médiateurs importants dans l'initiation, la progression et le développement des métastases dans le cancer [278]. Il a été montré une différence dans le niveau d'expression de la COX-2 entre les différents sous-types pathologiques des cancers du poumon. L'analyse histochimique de l'expression de COX-2 chez 59 patients souffrants de cancer du poumon a montré une surexpression de COX-2 dans 70% des cas d'adénocarcinomes invasifs. Cette étude suggère que COX-2 est associé au développement d'adénocarcinomes et à l'acquisition d'un phénotype invasif et métastatique de cancer [279] ce qui pourrait en faire marqueur de cancer pulmonaire. De la même manière, PGE2 a été trouvé à de fortes concentrations dans des tumeurs malignes pulmonaires humaines et est utilisé comme marqueur de cancer [280]. Jandl *et al* ont étudié le rôle des récepteurs du PGD2 sur les macrophages humains primaires et leurs capacités à influencer l'action des neutrophiles *in vitro* et *in vivo*. L'activation des récepteurs du PGD2 dans les macrophages humains stimulés avec du LPS améliore la migration et la survie des neutrophiles *in vitro* [281]. L'utilisation d'inhibiteurs des enzymes de la voie des eicosanoïdes, ou leurs récepteurs, rend la compréhension de cette voie importante à l'élaboration de nouvelles stratégies pour le traitement et la prévention du cancer du poumon.

Une altération de la voie des kynurénines a également été identifiée dans les macrophages pulmonaires humains et certains métabolites ont été quantifiés. L'étude transcriptomique dans notre modèle d'étude a montré une augmentation significative des enzymes intervenant dans cette voie (IDO1 et 2, KMO, KYNU et QPRT) en présence de LPS mais pas avec l'IL-4. Dans les macrophages activés par LPS, une forte augmentation de IDO1 a été observée ( $p < 0.0005$ ). L'acide quinolinique est apparu comme marqueur significatif entre les macrophages témoins et LPS dans l'étude métabolomique non ciblée. Une méthode de quantification ciblée sur 3 métabolites de cette voie a été développée. Les résultats révèlent une baisse de 70% du tryptophane. L'expression de la kynurénine et de l'acide quinolinique est indetectable ou très faible dans les cellules non stimulées et considérablement augmentée par le LPS. Une augmentation de 400% de l'hydroxy-tryptophane, précurseur de la sérotonine a été mesuré.

L'ajout de métabolites exogènes de la voie des kynurénines (acide quinolinique, kynurénine) à divers sous types de cellules immunitaires a montré qu'ils pouvaient inhiber sélectivement les cellules T activées et les cellules B [282].

Chez des patients atteints de pneumonie, l'IDO a été associé à la gravité de la maladie. Dans du plasma de patients souffrants de BPCO, les forts niveaux d'IDO et de tryptophane sont des marqueurs prédictifs de la maladie, en particulier le tryptophane qui est associé à une mortalité à 18 mois. L'IDO est associé à des niveaux élevés de protéine C-réactive (CRP) qui est analysée en routine à l'admission aux urgences comme marqueur de l'inflammation [133]. Dans une étude métabolomique, la kynurénine est apparue comme marqueur de la mortalité précoce (28 jours) dans des maladies telles que la pneumonie ou le sepsis [131]. Dans une population de patients atteints de pneumonie communautaire, des concentrations très élevées de kynurénines et très faible de tryptophane ont été trouvées dans le sang et seraient donc de bons marqueurs prédictifs de la pneumonie communautaire [132]. La concentration d'IDO était bien corrélée avec la gravité de la maladie.

Cette voie des kynurénines est aussi médiée dans les infections virales. L'infection par le virus de la grippe induit une augmentation d'IDO1 en passant par l'INF- $\gamma$  et de la kynurénine dans des macrophages primaires humains. L'augmentation d'IDO conduit à une surexpression de la kynurénine qui fonctionne comme immunomodulateur en contribuant à la réponse systémique de l'hôte à l'infection. La kynurénine est aussi exprimée en grande quantité dans les macrophages en réponse à une infection par des souches de grippe B ou par simple activation avec du LPS [130]. Le virus respiratoire syncytial (VRS) chez le nourrisson est considéré comme un facteur de risque pour le développement de l'asthme allergique chez l'enfant (4-8 ans) jusqu'à l'âge adulte en favorisant une réponse Th1 plus faible aux antigènes environnementaux pendant la petite enfance. Un lien entre IDO et RSV a été établi, en effet il est apparu que dans un modèle de cellules dendritiques, l'infection par le VRS était nécessaire pour l'activation d'IDO dépendante de la réplication du virus et indépendante des interférons [283].

L'ensemble des travaux cité sur l'activité d'IDO et de certaines kynurénines dans les pathologies pulmonaires font de ces dernières des marqueurs de gravité de ces maladies. Aucun métabolite appartenant à la voie des kynurénines n'a auparavant été mesuré dans des macrophages pulmonaires humains suivant le modèle de polarisation M1 et M2. Il serait intéressant de doser ces molécules dans les macrophages pulmonaires primaires de patients BPCO ou asthmatiques.



Dans des modèles d'études cellulaires tels que les MDM, une surproduction des intermédiaires du cycle de Krebs (malate, succinate, citrate) a été décrite [103], [104]. Tannahil *et al* ont dosé ces intermédiaires du cycle de Krebs à deux temps (4h et 24h) dans un modèle de BMDM (n=3) traités avec du LPS. On observe une augmentation de 2,4 fois par rapport au témoin à 4h et de 2,2 fois au bout de 24h par rapport aux témoins. La concentration de succinate augmente 1,3 fois et 2,2 fois au bout de 4h et 24 h, respectivement, par rapport aux témoins. La concentration de citrate augmente de 1,2 et 2 fois au bout de 4h et 24h respectivement par rapport aux témoins [103].

L'activation par le LPS produit une réaction inflammatoire qui stimule la fonction des macrophages pulmonaires. Ces derniers consomment alors plus d'ATP entraînant ainsi une augmentation de l'ATP synthase. Il se produit alors une surconsommation de O<sub>2</sub>, de NADH et de FADH<sub>2</sub>. L'activité du cycle de Krebs est dans ce cas accélérée et il peut y avoir une augmentation des intermédiaires comme le succinate et le malate.

Le succinate est un moteur de la production de cytokine inflammatoire. L'accumulation de succinate dans les macrophages stimulés par le LPS active HIF-1 $\alpha$  qui à son tour conduit à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires. Les travaux de l'UPRES EA220 montrent une augmentation du gène *HIF-1 $\alpha$*  d'un facteur 7 entre un groupe de macrophages pulmonaires humains polarisés M1 par du LPS et les témoins de façon très significative (P < 0,005).

Le niveau de malate pourrait nous apporter une indication sur les niveaux des autres métabolites du cycle de Krebs. La protéine HIF-1 $\alpha$  activée, augmente la destruction des bactéries intracellulaires par libération d'oxyde nitrique et de TNF- $\alpha$  par les macrophages.

L'inflammation est la réponse défensive qu'apporte l'organisme en réponse à un agent pathogène. Lors de la première phase d'invasion, les macrophages et les neutrophiles réagissent en dilatant les vaisseaux sanguins et en augmentant la perméabilité vasculaire pour rendre accessible le site de l'inflammation aux cellules du système immunitaire. Si l'inflammation n'est pas résolue, elle se transforme en inflammation chronique et engendre des conséquences telles qu'une faible oxygénation des tissus appelée hypoxie. On sait qu'en cas d'hypoxie NF- $\kappa$ B régule à la hausse la transcription du gène *HIF-1 $\alpha$* . Or HIF-1 $\alpha$  est connu comme étant un facteur régulateur important de processus cellulaire et physiologique comme l'angiogenèse [284]. Dans le cancer, HIF-1 $\alpha$  augmente la survie des neutrophiles en inhibant l'apoptose et déclenche une inflammation neutrophiles-dépendante. Il se produit alors une augmentation des facteurs chimiotactiques tels que CCL5, CXCL12, VEGF favorisant le

recrutement des cellules myéloïdes dans la tumeur. Une fois situés dans des régions hypoxiques, les macrophages associés aux tumeurs stabilisent l'expression de *HIF-1 $\alpha$* , ce qui contribue à l'inflammation et à l'angiogenèse [285]. Cependant le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans les maladies des voies respiratoires demeure complexe et très controversé en particulier à cause de fortes variations selon les modèles expérimentaux d'asthme ou d'allergie [286].

Dans un modèle de MDM murin, Jha *et al* montrent que l'accumulation de malate dans les macrophages polarisés M1 pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'arginosuccinate qui est l'intermédiaire reliant le cycle de krebs au cycle de l'urée. L'inhibition de la voie aspartate-arginosuccinate dans les macrophages polarisés M1 conduit à une baisse des niveaux de NO et de la production de la cytokine inflammatoire IL-6 [83]. Dans les macrophages polarisés M1, une augmentation des concentrations de malate (+59%, p=0,0200) et d'arginosuccinate (+336%, p=0,0343) est observée en comparaison aux témoins.

Au niveau des oxystérols, des variations ont été observées au niveau transcriptomique. Une forte sur-expression de l'enzyme 25-hydroxycholesterolase a été observée en présence de LPS. D'autres enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol étaient aussi modulées en présence de LPS (Figure 17). Lors de notre analyse ciblée des molécules présentes dans la voie des oxystérols, les mêmes observations n'ont pas été retrouvées. Entre la phase transcriptomique et la phase métabolomique, il peut y avoir un ensemble de modifications post-traductionnelles modifiant les expressions entre les transcrits et les molécules étudiées en métabolomique. Il n'y a pas eu des modifications significatives des concentrations des oxystérols mais des tendances ont été observées. Nos résultats sont en partie en accord avec les travaux de Mutemberezi *et al*, qui ont travaillé sur des cellules et dans un modèle de polarisation M1 et M2. On pourrait supposer que le temps d'incubation des cellules ne soit pas optimal pour cette famille de molécule pour que leurs concentrations soient modifiées sous l'effet des stimuli utilisés. Une étude des cinétiques d'incubation des macrophages pulmonaires et de quantification des oxystérols à différents temps peut être envisagée. Une autre limitation de cette quantification pourrait être la méthode de préparation des échantillons. Les cellules sont récupérées et congelées dans des tubes eppendorfs à -80°C pouvant entraîner une auto-oxydation de certains stérols ou la décomposition d'oxystérols. Des contaminations peuvent également avoir lieu avec ce moyen de conservation. Il existe une grande variation entre les individus sur les niveaux de concentrations des oxystérols chez

les témoins comme on peut le voir sur le Tableau 10. Cependant lorsqu'on regarde les données des patients individuellement, nous observons que les concentrations des oxystérols ne sont pas modifiées de la même manière en fonction des conditions. Il faudrait donc, pour cette étude, travailler sur un plus grand nombre d'échantillons pour mieux appréhender l'effet de la polarisation.

En se basant sur les résultats de nos analyses, nous observons que la polarisation M1 a un plus grand impact sur le métabolisme cellulaire des macrophages pulmonaires humains que la polarisation M2. En effet, les différentes voies énumérées dans la discussion sont modifiées par la polarisation M1. Au niveau des cytokines produites et des protéines membranaires, l'analyse a montré une grande différence entre les deux populations. Faces aux résultats de la polarisation en M2, nous nous sommes interrogés sur les conditions de culture cellulaire optimales pour favoriser la polarisation des macrophages pulmonaires humains en profil M2. Il a été démontré que les macrophages mettaient plus de temps à se polariser en M2. Dans les réactions inflammatoires, elle intervient au niveau de la phase chronique de l'inflammation qui met plus de temps à se mettre en place [41], [65], [70]. Nous avons travaillé sur des macrophages pulmonaires de patients cancéreux. De plus, tandis que le cancer est associé à un profil majoritairement M2 des macrophages, [70] la présence des deux types de population en fonction du niveau d'hypoxie a été signalée [69]. Ces observations nous poussent à nous interroger sur l'état de polarisation de nos macrophages issus des tissus pulmonaires. L'absence de différence entre les témoins et les macrophages pulmonaires traités par IL-4 pourrait être dûe à une pré-polarisation de type M2 des macrophages initiaux. Par ailleurs, les dosages des cytokines de ces mêmes macrophages ont montré un profil légèrement orienté M2 (UPRES EA220). Il se pourrait alors que le LPS ait polarisé les macrophages neutres qui étaient présents initialement et que nous comparions que les deux profils de polarisation M1 et M2 ne disposant pas ou peu de macrophages témoins (non polarisés).

Dans notre modèle cellulaire, la polarisation M1 est associée à une production accrue de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CCL2, 3, 4, 5, 24, CXCL1, 8, 10), à une augmentation des marqueurs membranaires CD38, CD197, à une régulation des enzymes de la voie des kynurénines et de l'acide arachidonique. L'étude métabolomique a montré une régulation différentielle des métabolites appartenant à la voie des kynurénines, de l'acide arachidonique et du cycle de Krebs. Tous ces métabolites identifiés ont en commun d'intervenir dans l'entretien et la régulation de la réaction inflammatoire.

En conclusion, cette étude métabolomique nous a permis d'identifier les différents profils des macrophages pulmonaires polarisés M1 et M2. Nos travaux ont permis de développer les méthodes d'analyses métabolomiques intéressantes sur des échantillons de cultures tissulaires. La méthodologie pourra être appliquée dans des tissus pulmonaires de patients asthmatiques, BPCO ou souffrant de mucoviscidose dans le but d'identifier de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la régulation de la polarisation au cours de ses différentes pathologies. Ceci permettra d'avoir une meilleure approche sur l'effet des traitements administrés aux patients sur l'inflammation pulmonaire et sa résolution.

## REFERENCES

- [1] S. Gordon, "Elie Metchnikoff: Father of natural immunity," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 12, pp. 3257–3264, Dec. 2008.
- [2] A. Shapouri-Moghaddam *et al.*, "Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease," *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 9, pp. 6425–6440, Sep. 2018.
- [3] A. Sica, P. Invernizzi, and A. Mantovani, "Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology," *Hepatology*, vol. 59, no. 5, pp. 2034–2042, 2014.
- [4] F. Bosque *et al.*, "The biology of macrophages," *Pathol. Biol. (Paris)*, vol. 45, no. 2, pp. 103–109, Feb. 1997.
- [5] S. Gordon, "Alternative activation of macrophages," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 1, pp. 23–35, Jan. 2003.
- [6] A. B. van oud Alblas and R. van Furth, "Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state," *J. Exp. Med.*, vol. 149, no. 6, pp. 1504–1518, Jun. 1979.
- [7] S. Gordon, "The macrophage: past, present and future," *Eur. J. Immunol.*, vol. 37 Suppl 1, pp. S9–17, Nov. 2007.
- [8] S. Epelman, K. J. Lavine, and G. J. Randolph, "Origin and Functions of Tissue Macrophages," *Immunity*, vol. 41, no. 1, pp. 21–35, Jul. 2014.
- [9] P. J. Murray and T. A. Wynn, "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 11, pp. 723–737, Nov. 2011.
- [10] G. W. Hunninghake, J. E. Gadek, O. Kawanami, V. J. Ferrans, and R. G. Crystal, "Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage," *Am. J. Pathol.*, vol. 97, no. 1, pp. 149–206, Oct. 1979.
- [11] A. J. Byrne, T. M. Maher, and C. M. Lloyd, "Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease?," *Trends Mol. Med.*, vol. 22, no. 4, pp. 303–316, Apr. 2016.
- [12] M. Naito, "Macrophage differentiation and function in health and disease," *Pathol. Int.*, vol. 58, no. 3, pp. 143–155, Mar. 2008.
- [13] P. J. Barnes, "Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)," *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.*, vol. 50 Online Pub, pp. OL627–637, 2004.
- [14] P. J. Barnes, "The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 41, no. 6, pp. 631–638, Dec. 2009.
- [15] A. P. Moreira and C. M. Hogaboam, "Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution," *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.*, vol. 31, no. 6, pp. 485–491, Jun. 2011.
- [16] S. Gordon, "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response," *Cell*, vol. 111, no. 7, pp. 927–930, Dec. 2002.
- [17] M. L. Lohmann-Matthes, C. Steinmüller, and G. Franke-Ullmann, "Pulmonary macrophages," *Eur. Respir. J.*, vol. 7, no. 9, pp. 1678–1689, Sep. 1994.
- [18] T. R. Mosmann, H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman, "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 136, no. 7, pp. 2348–2357, Apr. 1986.
- [19] C. Porta, E. Riboldi, A. Ippolito, and A. Sica, "Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation," *Semin. Immunol.*, vol. 27, no. 4, pp. 237–248, Aug. 2015.

- [20] N. Wang, H. Liang, and K. Zen, "Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance," *Front. Immunol.*, vol. 5, Nov. 2014.
- [21] C. F. Nathan, H. W. Murray, M. E. Wiebe, and B. Y. Rubin, "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity.," *J. Exp. Med.*, vol. 158, no. 3, pp. 670–689, Sep. 1983.
- [22] M. Stein, S. Keshav, N. Harris, and S. Gordon, "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation," *J. Exp. Med.*, vol. 176, no. 1, pp. 287–292, Jul. 1992.
- [23] F. O. Martinez and S. Gordon, "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment," *F1000Prime Rep.*, vol. 6, Mar. 2014.
- [24] C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, and A. M. Hill, "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 164, no. 12, pp. 6166–6173, Jun. 2000.
- [25] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization," *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686, Dec. 2004.
- [26] F. O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, and M. Locati, "Macrophage activation and polarization," *Front. Biosci. J. Virtual Libr.*, vol. 13, pp. 453–461, Jan. 2008.
- [27] C. J. Ferrante and S. J. Leibovich, "Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing," *Adv. Wound Care*, vol. 1, no. 1, pp. 10–16, Feb. 2012.
- [28] A. Mantovani, A. Sica, and M. Locati, "Macrophage Polarization Comes of Age," *Immunity*, vol. 23, no. 4, pp. 344–346, Oct. 2005.
- [29] D. M. Mosser, "The many faces of macrophage activation," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 73, no. 2, pp. 209–212, Feb. 2003.
- [30] D. M. Mosser and J. P. Edwards, "Exploring the full spectrum of macrophage activation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 12, pp. 958–969, Dec. 2008.
- [31] F. O. Martinez, L. Helming, and S. Gordon, "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 27, pp. 451–483, 2009.
- [32] M. L. Novak and T. J. Koh, "Macrophage phenotypes during tissue repair," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 93, no. 6, pp. 875–881, Jun. 2013.
- [33] S. Colin, G. Chinetti-Gbaguidi, and B. Staels, "Macrophage phenotypes in atherosclerosis," *Immunol. Rev.*, vol. 262, no. 1, pp. 153–166, Nov. 2014.
- [34] L. Wang, S. Zhang, H. Wu, X. Rong, and J. Guo, "M2b macrophage polarization and its roles in diseases," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 0, no. 0.
- [35] E. Obeid, R. Nanda, Y.-X. Fu, and O. I. Olopade, "The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review)," *Int. J. Oncol.*, vol. 43, no. 1, pp. 5–12, Jul. 2013.
- [36] J.-L. Mege and C. Capo, "La polarisation des macrophages, le noeud gordien des infections bactériennes ?," *médecine/sciences*, vol. 26, no. 1, pp. 83–88, Jan. 2010.
- [37] T. Röszer, "Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms," *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, 2015.
- [38] M. Benoit, B. Desnues, and J.-L. Mege, "Macrophage Polarization in Bacterial Infections," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 6, pp. 3733–3739, Sep. 2008.
- [39] A. Vazquez-Torres *et al.*, "Salmonella Pathogenicity Island 2-Dependent Evasion of the Phagocyte NADPH Oxidase," *Science*, vol. 287, no. 5458, pp. 1655–1658, Mar. 2000.
- [40] A. Refai, S. Gritli, M.-R. Barbouche, and M. Essafi, "Mycobacterium tuberculosis Virulent Factor ESAT-6 Drives Macrophage Differentiation Toward the Pro-inflammatory M1 Phenotype and Subsequently Switches It to the Anti-inflammatory M2 Phenotype," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 8, Sep. 2018.

- [41] G. Lugo-Villarino, C. Vérollet, I. Maridonneau-Parini, and O. Neyrolles, “Macrophage Polarization: Convergence Point Targeted by Mycobacterium Tuberculosis and HIV,” *Front. Immunol.*, vol. 2, Sep. 2011.
- [42] S. K. Pathak *et al.*, “Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages,” *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 6, pp. 610–618, Jun. 2007.
- [43] C. Lobry and R. Weil, “Mécanismes régulateurs de la voie NF- $\kappa$ B dans les lymphocytes T,” *médecine/sciences*, vol. 23, no. 10, pp. 857–861, Oct. 2007.
- [44] B. H. Miller *et al.*, “Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection,” *Infect. Immun.*, vol. 72, no. 5, pp. 2872–2878, May 2004.
- [45] J. Dornand, A. Gross, V. Lafont, J. Liautard, J. Oliaro, and J.-P. Liautard, “The innate immune response against *Brucella* in humans,” *Vet. Microbiol.*, vol. 90, no. 1–4, pp. 383–394, Dec. 2002.
- [46] A. C. Labonte, A.-C. Tosello-Tramont, and Y. S. Hahn, “The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases,” *Mol. Cells*, vol. 37, no. 4, pp. 275–285, Apr. 2014.
- [47] D. Raoult, T. Marrie, and J. Mege, “Natural history and pathophysiology of Q fever,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 5, no. 4, pp. 219–226, Apr. 2005.
- [48] M. Benoit, B. Barbarat, A. Bernard, D. Olive, and J.-L. Mege, “*Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 4, pp. 1065–1070, 2008.
- [49] Z. Huang *et al.*, “Mycobacterium tuberculosis-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas In Vitro,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 6, Jun. 2015.
- [50] Y. Sang, L. C. Miller, and F. Blecha, “Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions,” *J. Clin. Cell. Immunol.*, vol. 6, no. 2, Apr. 2015.
- [51] L. Cassetta *et al.*, “M1 polarization of human monocyte-derived macrophages restricts pre and postintegration steps of HIV-1 replication,” *AIDS*, vol. 27, no. 12, p. 1847, Jul. 2013.
- [52] Alfano Massimo, Graziano Francesca, Genovese Luca, and Poli Guido, “Macrophage Polarization at the Crossroad Between HIV-1 Infection and Cancer Development,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 6, pp. 1145–1152, Jun. 2013.
- [53] A. Sica, M. Erreni, P. Allavena, and C. Porta, “Macrophage polarization in pathology,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 21, pp. 4111–4126, Nov. 2015.
- [54] P. J. Barnes, “Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD,” *Clin. Sci.*, vol. 131, no. 13, pp. 1541–1558, Jul. 2017.
- [55] A. Saradna, D. C. Do, S. Kumar, Q.-L. Fu, and P. Gao, “Macrophage polarization and allergic asthma,” *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.*, vol. 191, pp. 1–14, 2018.
- [56] M. Fricker and P. G. Gibson, “Macrophage dysfunction in the pathogenesis and treatment of asthma,” *Eur. Respir. J.*, vol. 50, no. 3, p. 1700196, Sep. 2017.
- [57] Y.-C. Liu, X.-B. Zou, Y.-F. Chai, and Y.-M. Yao, “Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 10, no. 5, pp. 520–529, 2014.
- [58] Z. Jiang and L. Zhu, “Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma,” *J. Asthma Allergy*, vol. 9, pp. 101–107, Jun. 2016.
- [59] P. Robbe *et al.*, “Distinct macrophage phenotypes in allergic and nonallergic lung inflammation,” *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 308, no. 4, pp. L358–367, Feb. 2015.
- [60] C. Draijer, P. Robbe, C. E. Boorsma, M. N. Hylkema, and B. N. Melgert, “Characterization of Macrophage Phenotypes in Three Murine Models of House-Dust-

- Mite-Induced Asthma,” *Mediators of Inflammation*, 2013. [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/632049/>. [Accessed: 20-Jun-2019].
- [61] E. Y. Kim *et al.*, “Persistent activation of an innate immune axis translates respiratory viral infection into chronic lung disease,” *Nat. Med.*, vol. 14, no. 6, pp. 633–640, Jun. 2008.
- [62] K. Yamasaki and S. F. van Eeden, “Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, Feb. 2018.
- [63] M. S. Eapen *et al.*, “Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD),” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 13392, Oct. 2017.
- [64] Y. Kaku *et al.*, “Overexpression of CD163, CD204 and CD206 on Alveolar Macrophages in the Lungs of Patients with Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Jan. 2014.
- [65] E. Bazzan *et al.*, “Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity,” *Respir. Res.*, vol. 18, 2017.
- [66] S. He, L. Xie, J. Lu, and S. Sun, “Characteristics and potential role of M2 macrophages in COPD,” *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, vol. 12, pp. 3029–3039, Oct. 2017.
- [67] R. Shaykhiev *et al.*, “Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease,” *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 183, no. 4, pp. 2867–2883, Aug. 2009.
- [68] S. A. Almatroodi, C. F. McDonald, and D. S. Pouniotis, “Alveolar Macrophage Polarisation in Lung Cancer,” *Lung Cancer Int.*, vol. 2014, 2014.
- [69] S. R. Nielsen and M. C. Schmid, “Macrophages as Key Drivers of Cancer Progression and Metastasis,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2017, 2017.
- [70] M. Najafi *et al.*, “Macrophage polarity in cancer: A review,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 120, no. 3, pp. 2756–2765, 2019.
- [71] H. Yanagawa *et al.*, “Production of interleukin-10 by alveolar macrophages from lung cancer patients,” *Respir. Med.*, vol. 93, no. 9, pp. 666–671, Sep. 1999.
- [72] R. Nabioullin *et al.*, “Interleukin-10 is a potent inhibitor of tumor cytotoxicity by human monocytes and alveolar macrophages,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 55, no. 4, pp. 437–442, Apr. 1994.
- [73] A. R. Poh and M. Ernst, “Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside,” *Front. Oncol.*, vol. 8, Mar. 2018.
- [74] Q. Liu *et al.*, “The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 31, pp. 61–71, Oct. 2016.
- [75] J. J. W. Chen *et al.*, “Up-Regulation of Tumor Interleukin-8 Expression by Infiltrating Macrophages: Its Correlation with Tumor Angiogenesis and Patient Survival in Non-Small Cell Lung Cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 2, pp. 729–737, Feb. 2003.
- [76] G. Genard, S. Lucas, and C. Michiels, “Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages with Anticancer Therapies: Radiotherapy versus Chemo- and Immunotherapies,” *Front. Immunol.*, vol. 8, 2017.
- [77] A. Vidyarthi *et al.*, “TLR-3 Stimulation Skews M2 Macrophages to M1 Through IFN- $\alpha$  Signaling and Restricts Tumor Progression,” *Front. Immunol.*, vol. 9, Jul. 2018.
- [78] F. J. van Dalen, M. H. M. E. van Stevendaal, F. L. Fennemann, M. Verdoes, and O. Ilina, “Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages,” *Molecules*, vol. 24, no. 1, Dec. 2018.
- [79] A. Geelhaar-Karsch *et al.*, “Evaluation of arginine metabolism for the analysis of M1/M2 macrophage activation in human clinical specimens,” *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al*, vol. 62, no. 9, pp. 865–869, Sep. 2013.



- [80] S. K. Biswas and A. Mantovani, "Orchestration of metabolism by macrophages," *Cell Metab.*, vol. 15, no. 4, pp. 432–437, Apr. 2012.
- [81] G. Cairo, S. Recalcati, A. Mantovani, and M. Locati, "Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype," *Trends Immunol.*, vol. 32, no. 6, pp. 241–247, Jun. 2011.
- [82] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E. I. Closs, and M. Munder, "Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages," *Front. Immunol.*, vol. 5, Oct. 2014.
- [83] A. K. Jha *et al.*, "Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization," *Immunity*, vol. 42, no. 3, pp. 419–430, Mar. 2015.
- [84] P. C. Rodriguez, A. C. Ochoa, and A. A. Al-Khami, "Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity," *Front. Immunol.*, vol. 8, Feb. 2017.
- [85] J. MacMicking, Q. W. Xie, and C. Nathan, "Nitric oxide and macrophage function," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 15, pp. 323–350, 1997.
- [86] S. Galván-Peña and L. A. J. O'Neill, "Metabolic Reprograming in Macrophage Polarization," *Front. Immunol.*, vol. 5, 2014.
- [87] M. Munder, K. Eichmann, and M. Modolell, "Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 160, no. 11, pp. 5347–5354, Jun. 1998.
- [88] I. M. Corraliza, G. Soler, K. Eichmann, and M. Modolell, "Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE<sub>2</sub>) in murine bone-marrow-derived macrophages," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 206, no. 2, pp. 667–673, Jan. 1995.
- [89] C. D. Mills, "M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease," *Crit. Rev. Immunol.*, vol. 32, no. 6, pp. 463–488, 2012.
- [90] L. Campbell, C. R. Saville, P. J. Murray, S. M. Cruickshank, and M. J. Hardman, "Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, no. 10, pp. 2461–2470, Oct. 2013.
- [91] Q. Xu *et al.*, "NADPH Oxidases Are Essential for Macrophage Differentiation," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 38, pp. 20030–20041, Sep. 2016.
- [92] F. Jiang, Y. Zhang, and G. J. Dusting, "NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair," *Pharmacol. Rev.*, vol. 63, no. 1, pp. 218–242, Mar. 2011.
- [93] Y. Zhang, S. Choksi, K. Chen, Y. Pobeziinskaya, I. Linnoila, and Z.-G. Liu, "ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages," *Cell Res.*, vol. 23, no. 7, pp. 898–914, Jul. 2013.
- [94] H.-Y. Tan, N. Wang, S. Li, M. Hong, X. Wang, and Y. Feng, "The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/2795090/>. [Accessed: 16-Jul-2019].
- [95] N. Marques, C. Terret, and P. A. Cassier, "Rôle des monocytes et macrophages dans le microenvironnement tumoral," p. 5, 2015.
- [96] J. Canton, "Phagosome maturation in polarized macrophages," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 96, no. 5, pp. 729–738, 2014.

- [97] Y. Zhou, G. Lin, and M. P. Murtaugh, "Interleukin-4 suppresses the expression of macrophage NADPH oxidase heavy chain subunit (gp91-phox)," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1265, no. 1, pp. 40–48, Feb. 1995.
- [98] M. D. Kraaij, K. M. Koekkoek, S. W. van der Kooij, K. A. Gelderman, and C. van Kooten, "Subsets of human type 2 macrophages show differential capacity to produce reactive oxygen species," *Cell. Immunol.*, vol. 284, no. 1, pp. 1–8, Jul. 2013.
- [99] J.-C. Rodríguez-Prados *et al.*, "Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation," *J. Immunol.*, vol. 185, no. 1, pp. 605–614, Jul. 2010.
- [100] J. Blagih and R. G. Jones, "Polarizing Macrophages through Reprogramming of Glucose Metabolism," *Cell Metab.*, vol. 15, no. 6, pp. 793–795, Jun. 2012.
- [101] L. Zhu, Q. Zhao, T. Yang, W. Ding, and Y. Zhao, "Cellular Metabolism and Macrophage Functional Polarization," *Int. Rev. Immunol.*, vol. 34, no. 1, pp. 82–100, Jan. 2015.
- [102] F. De Santa, L. Vitiello, A. Torcinaro, and E. Ferraro, "The Role of Metabolic Remodeling in Macrophage Polarization and Its Effect on Skeletal Muscle Regeneration," *Antioxid. Redox Signal.*, Aug. 2018.
- [103] G. M. Tannahill *et al.*, "Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ ," *Nature*, vol. 496, no. 7444, pp. 238–242, Apr. 2013.
- [104] C. Diskin and E. M. Pålsson-McDermott, "Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function," *Front. Immunol.*, vol. 9, Feb. 2018.
- [105] L. A. J. O'Neill, "A Broken Krebs Cycle in Macrophages," *Immunity*, vol. 42, no. 3, pp. 393–394, Mar. 2015.
- [106] A. Haschemi *et al.*, "The Sedoheptulose Kinase CARKL Directs Macrophage Polarization through Control of Glucose Metabolism," *Cell Metab.*, vol. 15, no. 6, pp. 813–826, Jun. 2012.
- [107] E. L. Pearce and E. J. Pearce, "Metabolic Pathways In Immune Cell Activation And Quiescence," *Immunity*, vol. 38, no. 4, pp. 633–643, Apr. 2013.
- [108] D. Vats *et al.*, "Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation," *Cell Metab.*, vol. 4, no. 1, pp. 13–24, Jul. 2006.
- [109] J. Van den Bossche *et al.*, "Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages," *Cell Rep.*, vol. 17, no. 3, pp. 684–696, 11 2016.
- [110] A. Remmerie and C. L. Scott, "Macrophages and lipid metabolism," *Cell. Immunol.*, vol. 330, pp. 27–42, Aug. 2018.
- [111] C. E. Chalfant and S. Spiegel, "Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 20, pp. 4605–4612, Oct. 2005.
- [112] A. D. Dobrian, D. C. Lieb, B. K. Cole, D. A. Taylor-Fishwick, S. K. Chakrabarti, and J. L. Nadler, "Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases," *Prog. Lipid Res.*, vol. 50, no. 1, pp. 115–131, Jan. 2011.
- [113] S. J. A. Wuest, M. Crucet, C. Gemperle, C. Loretz, and M. Hersberger, "Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages," *Atherosclerosis*, vol. 225, no. 1, pp. 121–127, Nov. 2012.
- [114] F. O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani, "Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 10, pp. 7303–7311, Nov. 2006.
- [115] K. M. Rattigan *et al.*, "Metabolomic profiling of macrophages determines the discrete metabolomic signature and metabolomic interactome triggered by polarising immune stimuli," *PLoS ONE*, vol. 13, no. 3, Mar. 2018.

- [116] N. Braidy, R. Grant, B. J. Brew, S. Adams, T. Jayasena, and G. J. Guillemin, "Effects of Kynurenine Pathway Metabolites on Intracellular NAD<sup>+</sup> Synthesis and Cell Death in Human Primary Astrocytes and Neurons," *Int. J. Tryptophan Res. IJTR*, vol. 2, pp. 61–69, Apr. 2009.
- [117] R. Schwarcz, "The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 4, no. 1, pp. 12–17, Feb. 2004.
- [118] F. Moroni, "Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 375, no. 1, pp. 87–100, Jun. 1999.
- [119] R. Dick, B. P. Murray, M. J. Reid, and M. A. Correia, "Structure--function relationships of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase: identification of the putative heme-ligating histidine residues," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 392, no. 1, pp. 71–78, Aug. 2001.
- [120] M. Fukunaga *et al.*, "Studies on tissue and cellular distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase 2: the absence of IDO1 upregulates IDO2 expression in the epididymis," *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, vol. 60, no. 11, pp. 854–860, Nov. 2012.
- [121] Y. Murakami, M. Hoshi, Y. Imamura, Y. Arioka, Y. Yamamoto, and K. Saito, "Remarkable Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tryptophan Metabolites in Infectious Diseases: Potential Role in Macrophage-Mediated Inflammatory Diseases," *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, 2013.
- [122] P. Bortolotti, "Implications de la production de kynurénines par pseudomonas aeruginosa dans la relation hôte-pathogène," thesis, Lille 2, 2016.
- [123] B. Heng, C. K. Lim, D. B. Lovejoy, A. Bessede, L. Gluch, and G. J. Guillemin, "Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology," *Oncotarget*, vol. 7, no. 6, pp. 6506–6520, Dec. 2015.
- [124] T. Regan *et al.*, "Effects of anti-inflammatory drugs on the expression of tryptophan-metabolism genes by human macrophages," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 103, no. 4, pp. 681–692, Apr. 2018.
- [125] C. K. Lim *et al.*, "Characterization of the Kynurenine Pathway and Quinolinic Acid Production in Macaque Macrophages," *Int. J. Tryptophan Res. IJTR*, vol. 6, pp. 7–19, May 2013.
- [126] K. F. van der Sluijs *et al.*, "Systemic tryptophan and kynurenine catabolite levels relate to severity of rhinovirus-induced asthma exacerbation: a prospective study with a parallel-group design," *Thorax*, vol. 68, no. 12, pp. 1122–1130, Dec. 2013.
- [127] A. A.-B. Badawy, "Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects," *Int. J. Tryptophan Res. IJTR*, vol. 10, Mar. 2017.
- [128] G. Briend and P. Devillier, "Implication de la voie des kynurénines dans la polarisation des macrophages pulmonaires humains," *Rev. Mal. Respir.*, vol. 31, no. 9, p. 879, Nov. 2014.
- [129] S.-M. Lee *et al.*, "Inhibition of acute lethal pulmonary inflammation by the IDO–AhR pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 29, pp. E5881–E5890, Jul. 2017.
- [130] L. Gaelings *et al.*, "Regulation of kynurenine biosynthesis during influenza virus infection," *FEBS J.*, vol. 284, no. 2, pp. 222–236, 2017.
- [131] A. J. Rogers *et al.*, "Metabolomic Derangements Are Associated with Mortality in Critically Ill Adult Patients," *PLOS ONE*, vol. 9, no. 1, p. e87538, Jan. 2014.
- [132] Y. Suzuki *et al.*, "Serum activity of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts prognosis of community-acquired pneumonia," *J. Infect.*, vol. 63, no. 3, pp. 215–222, Sep. 2011.
- [133] M. A. Meier *et al.*, "Activation of the Serotonin Pathway is Associated with Poor Outcome in COPD Exacerbation: Results of a Long-Term Cohort Study," *Lung*, vol. 195, no. 3, pp. 303–311, Jun. 2017.

- [134] D. Lütjohann, "Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols," *Br. J. Nutr.*, vol. 91, no. 1, pp. 3–4, Jan. 2004.
- [135] Z. Hu, B. He, L. Ma, Y. Sun, Y. Niu, and B. Zeng, "Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*," *Indian J. Microbiol.*, vol. 57, no. 3, pp. 270–277, Sep. 2017.
- [136] A. Vejux, T. Montange, L. Martine, A. Zarrouk, J.-M. Riedinger, and G. Lizard, "Absence of oxysterol-like side effects in human monocytic cells treated with phytosterols and oxyphytosterols," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 16, pp. 4060–4066, 2012.
- [137] C. Adcox, L. Boyd, L. Oehrl, J. Allen, and G. Fenner, "Comparative Effects of Phytosterol Oxides and Cholesterol Oxides in Cultured Macrophage-Derived Cell Lines," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 4, pp. 2090–2095, Apr. 2001.
- [138] M. Valerio *et al.*, "Phytosterols ameliorate clinical manifestations and inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis," *Inflamm. Res.*, vol. 60, no. 5, pp. 457–465, May 2011.
- [139] R. Liu *et al.*, " $\beta$ -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice," *Pharm. Biol.*, vol. 57, no. 1, pp. 161–168, Dec. 2019.
- [140] N. J. Spann and C. K. Glass, "Sterols and oxysterols in immune cell function," *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 9, pp. 893–900, Sep. 2013.
- [141] Y. Sakakura *et al.*, "Sterol Regulatory Element-Binding Proteins Induce an Entire Pathway of Cholesterol Synthesis," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 286, no. 1, pp. 176–183, Aug. 2001.
- [142] E. J. Zerenturk, L. J. Sharpe, E. Ikonen, and A. J. Brown, "Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis," *Prog. Lipid Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 666–680, Oct. 2013.
- [143] "Cholesterol: Synthesis, Metabolism, Regulation." [Online]. Available: <https://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol.php#synthesis>. [Accessed: 07-Mar-2019].
- [144] V. M. Olkkonen, O. Béaslas, and E. Nissilä, "Oxysterols and Their Cellular Effectors," *Biomolecules*, vol. 2, no. 1, pp. 76–103, Feb. 2012.
- [145] V. M. Olkkonen and R. Hynynen, "Interactions of oxysterols with membranes and proteins," *Mol. Aspects Med.*, vol. 30, no. 3, pp. 123–133, Jun. 2009.
- [146] A. J. Brown and W. Jessup, "Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis," *Mol. Aspects Med.*, vol. 30, no. 3, pp. 111–122, Jun. 2009.
- [147] N. Abudu, J. J. Miller, and S. S. Levinson, "Lipoprotein Oxidation Products and Arteriosclerosis: Theory and Methods with Applicability to the Clinical Chemistry Laboratory," in *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 38, Elsevier, 2004, pp. 1–35.
- [148] G. Testa, D. Rossin, G. Poli, F. Biasi, and G. Leonarduzzi, "Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases," *Biochimie*, vol. 153, pp. 220–231, Oct. 2018.
- [149] B. Sottero, P. Gamba, S. Gargiulo, G. Leonarduzzi, and G. Poli, "Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry," *Curr. Med. Chem.*, vol. 16, no. 6, pp. 685–705, 2009.
- [150] M. Souidi *et al.*, "Les oxystérols : métabolisme, rôles biologiques et pathologies associées," </data/revues/03998320/00280003/279/>, Feb. 2008.
- [151] D. W. Russell, "Oxysterol biosynthetic enzymes," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1529, no. 1, pp. 126–135, Dec. 2000.
- [152] C. R. Pullinger *et al.*, "Human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype," *J. Clin. Invest.*, vol. 110, no. 1, pp. 109–117, Jul. 2002.

- [153] A. Rutkowska, S. A. O'Sullivan, I. Christen, J. Zhang, A. W. Sailer, and K. K. Dev, "The EBI2 signalling pathway plays a role in cellular crosstalk between astrocytes and macrophages," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 25520, May 2016.
- [154] S. Sun and C. Liu, " $7\alpha$ , 25-dihydroxycholesterol-mediated activation of EBI2 in immune regulation and diseases," *Front. Pharmacol.*, vol. 6, Mar. 2015.
- [155] U. Diczfalusy, H. Nylén, P. Elander, and L. Bertilsson, " $4\beta$ -hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, vol. 71, no. 2, pp. 183–189, Feb. 2011.
- [156] N. J. Spann *et al.*, "Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses," *Cell*, vol. 151, no. 1, pp. 138–152, Sep. 2012.
- [157] J. G. Cyster, E. V. Dang, A. Reboldi, and T. Yi, "25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 11, pp. 731–743, Nov. 2014.
- [158] E. S. Gold *et al.*, "25-Hydroxycholesterol acts as an amplifier of inflammatory signaling," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 29, pp. 10666–10671, Jul. 2014.
- [159] D. R. Bauman, A. D. Bitmansour, J. G. McDonald, B. M. Thompson, G. Liang, and D. W. Russell, "25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 39, pp. 16764–16769, Sep. 2009.
- [160] A. Reboldi, E. V. Dang, J. G. McDonald, G. Liang, D. W. Russell, and J. G. Cyster, "Inflammation. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon," *Science*, vol. 345, no. 6197, pp. 679–684, Aug. 2014.
- [161] M. C. Englund, A. L. Karlsson, O. Wiklund, G. Bondjers, and B. G. Ohlsson, "25-hydroxycholesterol induces lipopolysaccharide-tolerance and decreases a lipopolysaccharide-induced TNF-alpha secretion in macrophages," *Atherosclerosis*, vol. 158, no. 1, pp. 61–71, Sep. 2001.
- [162] U. Diczfalusy *et al.*, "Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide," *J. Lipid Res.*, vol. 50, no. 11, pp. 2258–2264, Nov. 2009.
- [163] A. Koarai *et al.*, "25-Hydroxycholesterol enhances cytokine release and Toll-like receptor 3 response in airway epithelial cells," *Respir. Res.*, vol. 13, p. 63, Jul. 2012.
- [164] S. Dzeletovic, O. Breuer, E. Lund, and U. Diczfalusy, "Determination of Cholesterol Oxidation Products in Human Plasma by Isotope Dilution-Mass Spectrometry," *Anal. Biochem.*, vol. 225, no. 1, pp. 73–80, Feb. 1995.
- [165] P. Italiani *et al.*, "Transcriptomic Profiling of the Development of the Inflammatory Response in Human Monocytes In Vitro," *PLOS ONE*, vol. 9, no. 2, p. e87680, Feb. 2014.
- [166] R. D. Stout and J. Suttles, "Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 76, no. 3, pp. 509–513, Sep. 2004.
- [167] T. Victoni *et al.*, "Human lung and monocyte-derived macrophages differ with regard to the effects of  $\beta$ 2-adrenoceptor agonists on cytokine release," *Respir. Res.*, vol. 18, 2017.
- [168] P. J. Groot-Kormelink, L. Fawcett, P. D. Wright, M. Gosling, and T. C. Kent, "Quantitative GPCR and ion channel transcriptomics in primary alveolar macrophages and macrophage surrogates," *BMC Immunol.*, vol. 13, no. 1, p. 57, Oct. 2012.
- [169] A. Lescoat *et al.*, "Distinct Properties of Human M-CSF and GM-CSF Monocyte-Derived Macrophages to Simulate Pathological Lung Conditions In Vitro: Application to Systemic and Inflammatory Disorders with Pulmonary Involvement," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 3, Mar. 2018.

- [170] C. H. Johnson, J. Ivanisevic, and G. Siuzdak, "Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 7, pp. 451–459, 2016.
- [171] A. Scalbert *et al.*, "Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research," *Metabolomics*, vol. 5, no. 4, pp. 435–458, Dec. 2009.
- [172] F.-P. J. Martin *et al.*, "A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 3, May 2007.
- [173] E. von Roepenack-Lahaye *et al.*, "Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry," *Plant Physiol.*, vol. 134, no. 2, pp. 548–559, Feb. 2004.
- [174] F. Courant, J.-P. Antignac, G. Dervilly-Pinel, and B. Le Bizec, "Basics of mass spectrometry based metabolomics," *Proteomics*, vol. 14, no. 21–22, pp. 2369–2388, Nov. 2014.
- [175] K. Suhre and C. Gieger, "Genetic variation in metabolic phenotypes: study designs and applications," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 11, pp. 759–769, Nov. 2012.
- [176] S.-Y. Park, Y.-W. Kim, J.-E. Kim, and J.-Y. Kim, "Age-associated changes in fat metabolism in the rat and its relation to sympathetic activity," *Life Sci.*, vol. 79, no. 23, pp. 2228–2233, Nov. 2006.
- [177] M. P. Hodson *et al.*, "A gender-specific discriminator in Sprague–Dawley rat urine: The deployment of a metabolic profiling strategy for biomarker discovery and identification," *Anal. Biochem.*, vol. 362, no. 2, pp. 182–192, Mar. 2007.
- [178] M.-E. Dumas *et al.*, "Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 7, pp. 2199–2208, Apr. 2006.
- [179] J. M. C. D. L. Barca, D. Mirebeau-Prunier, V. Moal, P. Reynier, R. Garnotel, and G. Simard, "Metabolome and mass spectrometry: new biomedical analysis perspectives," *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, no. 1, pp. 126–130, 2015-2.
- [180] K. Kim *et al.*, "Mealtime, temporal, and daily variability of the human urinary and plasma metabolomes in a tightly controlled environment," *PloS One*, vol. 9, no. 1, p. e86223, 2014.
- [181] K. Bando *et al.*, "Influences of biofluid sample collection and handling procedures on GC-MS based metabolomic studies," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 110, no. 4, pp. 491–499, Oct. 2010.
- [182] R. P. Maharjan and T. Ferenci, "Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*," *Anal. Biochem.*, vol. 313, no. 1, pp. 145–154, Feb. 2003.
- [183] C. L. Winder *et al.*, "Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 8, pp. 2939–2948, Apr. 2008.
- [184] X. Duportet, R. B. M. Aggio, S. Carneiro, and S. G. Villas-Bôas, "The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used," *Metabolomics*, vol. 8, no. 3, pp. 410–421, Jun. 2012.
- [185] E. G. Bligh and W. J. Dyer, "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification," *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, Aug. 1959.
- [186] F. Fei, D. M. E. Bowdish, and B. E. McCarry, "Comprehensive and simultaneous coverage of lipid and polar metabolites for endogenous cellular metabolomics using HILIC-TOF-MS," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 15, pp. 3723–3733, Jun. 2014.
- [187] L. Lin, Z. Huang, Y. Gao, X. Yan, J. Xing, and W. Hang, "LC-MS based serum metabonomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery," *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 3, pp. 1396–1405, Mar. 2011.

- [188] X. Cai and R. Li, "Concurrent profiling of polar metabolites and lipids in human plasma using HILIC-FTMS," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 36490, Nov. 2016.
- [189] X. Cai *et al.*, "Analysis of highly polar metabolites in human plasma by ultra-performance hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 650, no. 1, pp. 10–15, Sep. 2009.
- [190] B. Madji Hounoum, H. Blasco, P. Emond, and S. Mavel, "Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry-based cell metabolomics: Experimental design, recommendations, and applications," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 118–128, Jan. 2016.
- [191] E. Cequier-Sánchez, C. Rodríguez, A. G. Ravelo, and R. Zárate, "Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 12, pp. 4297–4303, Jun. 2008.
- [192] H. Bi, K. W. Krausz, S. K. Manna, F. Li, C. H. Johnson, and F. J. Gonzalez, "Optimization of harvesting, extraction, and analytical protocols for UPLC-ESI-MS-based metabolomic analysis of adherent mammalian cancer cells," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 15, pp. 5279–5289, Jun. 2013.
- [193] J. C. García-Cañaveras, S. López, J. V. Castell, M. T. Donato, and A. Lahoz, "Extending metabolome coverage for untargeted metabolite profiling of adherent cultured hepatic cells," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 4, pp. 1217–1230, Feb. 2016.
- [194] D. Vuckovic, "Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 403, no. 6, pp. 1523–1548, Jun. 2012.
- [195] F. Tugizimana, P. A. Steenkamp, L. A. Piater, and I. A. Dubery, "Mass spectrometry in untargeted liquid chromatography/mass spectrometry metabolomics: Electrospray ionisation parameters and global coverage of the metabolome," *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, vol. 32, no. 2, pp. 121–132, Jan. 2018.
- [196] C. Ranninger *et al.*, "Improving global feature detectabilities through scan range splitting for untargeted metabolomics by high-performance liquid chromatography–Orbitrap mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 930, pp. 13–22, Aug. 2016.
- [197] O. Fiehn, "Metabolomics by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: the combination of targeted and untargeted profiling," *Curr. Protoc. Mol. Biol. Ed. Frederick M Ausubel Al*, vol. 114, pp. 30.4.1–30.4.32, Apr. 2016.
- [198] H. Lu, Y. Liang, W. B. Dunn, H. Shen, and D. B. Kell, "Comparative evaluation of software for deconvolution of metabolomics data based on GC-TOF-MS," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 27, no. 3, pp. 215–227, Mar. 2008.
- [199] R. Verpoorte, Y. H. Choi, N. R. Mustafa, and H. K. Kim, "Metabolomics: back to basics," *Phytochem. Rev.*, vol. 7, no. 3, pp. 525–537, Oct. 2008.
- [200] M. Vinaixa, E. L. Schymanski, S. Neumann, M. Navarro, R. M. Salek, and O. Yanes, "Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 78, pp. 23–35, Apr. 2016.
- [201] J. M. Halket, D. Waterman, A. M. Przyborowska, R. K. P. Patel, P. D. Fraser, and P. M. Bramley, "Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS," *J. Exp. Bot.*, vol. 56, no. 410, pp. 219–243, Jan. 2005.
- [202] J. M. Halket and V. G. Zaikin, "Derivatization in Mass Spectrometry—1. Silylation," *Eur. J. Mass Spectrom.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–21, Feb. 2003.
- [203] S. Kumari, D. Stevens, T. Kind, C. Denkert, and O. Fiehn, "Applying in-silico retention index and mass spectra matching for identification of unknown metabolites in accurate mass GC-TOF mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 15, pp. 5895–5902, Aug. 2011.

- [204] H. Kanani, P. K. Chrysanthopoulos, and M. I. Klapa, "Standardizing GC-MS metabolomics," *J. Chromatogr. B*, vol. 871, no. 2, pp. 191–201, Aug. 2008.
- [205] D.-Q. Tang, L. Zou, X.-X. Yin, and C. N. Ong, "HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 35, no. 5, pp. 574–600, 2016.
- [206] G. Theodoridis, H. G. Gika, and I. D. Wilson, "Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 30, no. 5, pp. 884–906, 2011.
- [207] G. A. Theodoridis, H. G. Gika, E. J. Want, and I. D. Wilson, "Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 711, pp. 7–16, Jan. 2012.
- [208] A. Lafaye, J. Labarre, J.-C. Tabet, E. Ezan, and C. Junot, "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and <sup>15</sup>N Metabolic Labeling for Quantitative Metabolic Profiling," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 7, pp. 2026–2033, Apr. 2005.
- [209] E. Eckert, H. Drexler, and T. Göen, "Determination of six hydroxyalkyl mercapturic acids in human urine using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HILIC-ESI-MS/MS)," *J. Chromatogr. B*, vol. 878, no. 27, pp. 2506–2514, Oct. 2010.
- [210] J. Martens-Lobenhoffer, A. Surdacki, and S. M. Bode-Böger, "Fast and Precise Quantification of l-Homoarginine in Human Plasma by HILIC-Isotope Dilution-MS-MS," *Chromatographia*, vol. 76, no. 23, pp. 1755–1759, Dec. 2013.
- [211] A. Conventz *et al.*, "Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 860, no. 1, pp. 78–85, Dec. 2007.
- [212] N. Sriboonvorakul *et al.*, "Liquid chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous determination of small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria," *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, vol. 941, pp. 116–122, Dec. 2013.
- [213] M. Scherer, K. Leuthäuser-Jaschinski, J. Ecker, G. Schmitz, and G. Liebisch, "A rapid and quantitative LC-MS/MS method to profile sphingolipids," *J. Lipid Res.*, vol. 51, no. 7, pp. 2001–2011, Jul. 2010.
- [214] P. Kiefer, J.-C. Portais, and J. A. Vorholt, "Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry," *Anal. Biochem.*, vol. 382, no. 2, pp. 94–100, Nov. 2008.
- [215] S. Boudah *et al.*, "Annotation of the human serum metabolome by coupling three liquid chromatography methods to high-resolution mass spectrometry," *J. Chromatogr. B*, vol. 966, pp. 34–47, Sep. 2014.
- [216] K. Contrepois, L. Jiang, and M. Snyder, "Optimized Analytical Procedures for the Untargeted Metabolomic Profiling of Human Urine and Plasma by Combining Hydrophilic Interaction (HILIC) and Reverse-Phase Liquid Chromatography (RPLC)-Mass Spectrometry," *Mol. Cell. Proteomics MCP*, vol. 14, no. 6, pp. 1684–1695, Jun. 2015.
- [217] J. Ivanisevic *et al.*, "Toward 'omic scale metabolite profiling: a dual separation-mass spectrometry approach for coverage of lipid and central carbon metabolism," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 14, pp. 6876–6884, Jul. 2013.
- [218] T. J. Comi, T. D. Do, S. S. Rubakhin, and J. V. Sweedler, "Categorizing Cells on the Basis of their Chemical Profiles: Progress in Single-Cell Mass Spectrometry," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, no. 11, pp. 3920–3929, Mar. 2017.



- [219] M. Cuperlović-Culf, D. A. Barnett, A. S. Culf, and I. Chute, "Cell culture metabolomics: applications and future directions," *Drug Discov. Today*, vol. 15, no. 15–16, pp. 610–621, Aug. 2010.
- [220] C. A. Sellick *et al.*, "Effective Quenching Processes for Physiologically Valid Metabolite Profiling of Suspension Cultured Mammalian Cells," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 1, pp. 174–183, Jan. 2009.
- [221] S. X.-F. Adamson, R. Wang, W. Wu, B. Cooper, and J. Shannahan, "Metabolomic insights of macrophage responses to graphene nanoplatelets: Role of scavenger receptor CD36," *PLoS ONE*, vol. 13, no. 11, Nov. 2018.
- [222] C. Zhao, Z. Tang, J. Yan, J. Fang, H. Wang, and Z. Cai, "Bisphenol S exposure modulate macrophage phenotype as defined by cytokines profiling, global metabolomics and lipidomics analysis," *Sci. Total Environ.*, vol. 592, pp. 357–365, Aug. 2017.
- [223] J. A. Hollenbaugh, C. Montero, R. F. Schinazi, J. Munger, and B. Kim, "Metabolic profiling during HIV-1 and HIV-2 infection of primary human monocyte-derived macrophages," *Virology*, vol. 491, pp. 106–114, Apr. 2016.
- [224] S. Forcisi, F. Moritz, B. Kanawati, D. Tziotis, R. Lehmann, and P. Schmitt-Kopplin, "Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling," *J. Chromatogr. A*, vol. 1292, pp. 51–65, May 2013.
- [225] "Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrometrie de masse." [Online]. Available: [http://www.spectraanalyse.fr/wp-content/uploads/2012/05/SA242\\_13-25.pdf](http://www.spectraanalyse.fr/wp-content/uploads/2012/05/SA242_13-25.pdf). [Accessed: 30-Jan-2019].
- [226] W. C. Byrdwell, "Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids," *Lipids*, vol. 36, no. 4, pp. 327–346, Apr. 2001.
- [227] J. Lembcke, U. Ceglarek, G. M. Fiedler, S. Baumann, A. Leichtle, and J. Thiery, "Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS," *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 1, pp. 21–26, Jan. 2005.
- [228] M. Takino, S. Daishima, and T. Nakahara, "Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1011, no. 1, pp. 67–75, Sep. 2003.
- [229] N. Yoshioka, Y. Akiyama, and K. Teranishi, "Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization," *J. Chromatogr. A*, vol. 1022, no. 1, pp. 145–150, Jan. 2004.
- [230] E. A. Straube, W. Dekant, and W. Völkel, "Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization for the analysis of dinitropyrene and aminonitropyrene LC-MS/MS," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, no. 12, pp. 1853–1862, Dec. 2004.
- [231] A. O. Nier, "A Mass Spectrometer for Isotope and Gas Analysis," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 18, no. 6, pp. 398–411, Jun. 1947.
- [232] E. Werner, "Analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse : application à la recherche de biomarqueurs indirects d'induction enzymatique," phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2011.
- [233] M. Croyal, "Apports des évolutions de la spectrométrie de masse pour l'étude statique et dynamique du métabolisme des lipides et des lipoprotéines," thesis, Nantes, 2017.
- [234] A. Makarov, "Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 6, pp. 1156–1162, Mar. 2000.
- [235] "Dispositifs à piégeage d'ions," *Techniques de l'Ingénieur*. [Online]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses->

- th1/spectrometries-42390210/spectrometrie-de-masse-organique-p2647/dispositifs-a-piegeage-d-ions-p2647niv10003.html. [Accessed: 04-Dec-2018].
- [236] B. O. Keller, J. Sui, A. B. Young, and R. M. Whittall, "Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 627, no. 1, pp. 71–81, Oct. 2008.
- [237] C. L. Stumpf and J. Goshawk, "MarkerLynx Application Manager: Informatics for Mass Spectrometric Metabonomic Discovery," p. 4.
- [238] C. A. Smith, E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, and G. Siuzdak, "XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 3, pp. 779–787, Feb. 2006.
- [239] A. Lommen, "MetAlign: Interface-Driven, Versatile Metabolomics Tool for Hyphenated Full-Scan Mass Spectrometry Data Preprocessing," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 8, pp. 3079–3086, Apr. 2009.
- [240] M. Katajamaa and M. Oresic, "Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data," *BMC Bioinformatics*, vol. 6, p. 179, Jul. 2005.
- [241] R. Tautenhahn, C. Böttcher, and S. Neumann, "Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS," *BMC Bioinformatics*, vol. 9, no. 1, p. 504, Nov. 2008.
- [242] G. Libiseller *et al.*, "IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters," *BMC Bioinformatics*, vol. 16, Apr. 2015.
- [243] F. Giacomoni *et al.*, "Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics," *Bioinformatics*, vol. 31, no. 9, pp. 1493–1495, May 2015.
- [244] Y. Wu and L. Li, "Sample normalization methods in quantitative metabolomics," *J. Chromatogr. A*, vol. 1430, pp. 80–95, Jan. 2016.
- [245] C. Kuhl, R. Tautenhahn, C. Böttcher, T. R. Larson, and S. Neumann, "CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of LC/MS data sets," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 1, pp. 283–289, Jan. 2012.
- [246] M. R. Viant, I. J. Kurland, M. R. Jones, and W. B. Dunn, "How close are we to complete annotation of metabolomes?," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 36, pp. 64–69, Feb. 2017.
- [247] R. Chaleckis, I. Meister, P. Zhang, and C. E. Wheelock, "Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC–MS-based metabolomics," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 55, pp. 44–50, Feb. 2019.
- [248] L. W. Sumner *et al.*, "Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI)," *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.*, vol. 3, no. 3, pp. 211–221, Sep. 2007.
- [249] W. B. Dunn *et al.*, "Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics," *Metabolomics*, vol. 9, no. 1, pp. 44–66, Mar. 2013.
- [250] F. Fenaille, P. Barbier Saint-Hilaire, K. Rousseau, and C. Junot, "Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand?," *J. Chromatogr. A*, vol. 1526, pp. 1–12, Dec. 2017.
- [251] J. Chong *et al.*, "MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis," *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W486–W494, Jul. 2018.
- [252] S. Li *et al.*, "Predicting Network Activity from High Throughput Metabolomics," *PLoS Comput. Biol.*, vol. 9, no. 7, Jul. 2013.
- [253] S. Jeyaseelan *et al.*, "Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein is critical for early lung immune responses against *Escherichia coli* lipopolysaccharide and viable

- Escherichia coli," *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, vol. 175, no. 11, pp. 7484–7495, Dec. 2005.
- [254] A. Buenestado *et al.*, "Roflumilast inhibits the release of chemokines and TNF- $\alpha$  from human lung macrophages stimulated with lipopolysaccharide," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 165, no. 6, pp. 1877–1890, Mar. 2012.
- [255] A. Kalli, G. T. Smith, M. J. Sweredoski, and S. Hess, "Evaluation and Optimization of Mass Spectrometric Settings during Data-Dependent Acquisition Mode: Focus on LTQ-Orbitrap Mass Analyzers," *J. Proteome Res.*, vol. 12, no. 7, pp. 3071–3086, Jul. 2013.
- [256] R. Adusumilli and P. Mallick, "Data Conversion with ProteoWizard msConvert," *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1550, pp. 339–368, 2017.
- [257] R. Wehrens, G. Weingart, and F. Mattivi, "metaMS: an open-source pipeline for GC-MS-based untargeted metabolomics," *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 966, pp. 109–116, Sep. 2014.
- [258] P. Rinaudo, S. Boudah, C. Junot, and E. A. Thévenot, "biosigner: A New Method for the Discovery of Significant Molecular Signatures from Omics Data," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 3, 2016.
- [259] R. G. Brereton and G. R. Lloyd, "Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away: PLS-DA: taking the magic away," *J. Chemom.*, vol. 28, no. 4, pp. 213–225, Apr. 2014.
- [260] J. G. McDonald and D. W. Russell, "Editorial: 25-Hydroxycholesterol: a new life in immunology," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 88, no. 6, pp. 1071–1072, Dec. 2010.
- [261] W. J. Griffiths, J. Abdel-Khalik, P. J. Crick, E. Yutuc, and Y. Wang, "New methods for analysis of oxysterols and related compounds by LC-MS," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 162, pp. 4–26, Sep. 2016.
- [262] J. G. McDonald, C. L. Cummins, R. M. Barkley, B. M. Thompson, and H. A. Lincoln, "Identification and Quantitation of Sorbitol-Based Nuclear Clarifying Agents Extracted from Common Laboratory and Consumer Plasticware Made of Polypropylene," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 14, pp. 5532–5541, Jul. 2008.
- [263] J. G. McDonald, D. D. Smith, A. R. Stiles, and D. W. Russell, "A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma," *J. Lipid Res.*, vol. 53, no. 7, pp. 1399–1409, Jul. 2012.
- [264] J. B. Lin *et al.*, "Oxysterol Signatures Distinguish Age-Related Macular Degeneration from Physiologic Aging," *EBioMedicine*, vol. 32, pp. 9–20, Jun. 2018.
- [265] P. J. Crick, T. W. Bentley, Y. Wang, and W. J. Griffiths, "Revised sample preparation for the analysis of oxysterols by enzyme-assisted derivatisation for sterol analysis (EADSA)," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 17, pp. 5235–5239, 2015.
- [266] V. Mutemberezi, B. Buisseret, J. Masquelier, O. Guillemot-Legris, M. Alhouayek, and G. G. Muccioli, "Oxysterol levels and metabolism in the course of neuroinflammation: insights from in vitro and in vivo models," *J. Neuroinflammation*, vol. 15, Mar. 2018.
- [267] M. Haid *et al.*, "Long-Term Stability of Human Plasma Metabolites during Storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ ," *J. Proteome Res.*, vol. 17, no. 1, pp. 203–211, Jan. 2018.
- [268] Y. Ni *et al.*, "Metabolic profiling using combined GC-MS and LC-MS provides a systems understanding of aristolochic acid-induced nephrotoxicity in rat," *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 4, pp. 707–711, 2007.
- [269] M. Ciborowski *et al.*, "Combination of LC-MS- and GC-MS-based Metabolomics to Study the Effect of Ozonated Autohemotherapy on Human Blood," *J. Proteome Res.*, vol. 11, no. 12, pp. 6231–6241, Dec. 2012.
- [270] L. Housley *et al.*, "Untargeted Metabolomic Screen Reveals Changes in Human Plasma Metabolite Profiles Following Consumption of Fresh Broccoli Sprouts," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 62, no. 19, p. 1700665, 2018.

- [271] M. Jové *et al.*, “A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 12, pp. 19522–19533, Jan. 2017.
- [272] H. Zhou *et al.*, “Prognostic biomarkers of cervical squamous cell carcinoma identified via plasma metabolomics,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 98, no. 26, Jun. 2019.
- [273] N. G. Mahieu and G. J. Patti, “Systems-Level Annotation of a Metabolomics Data Set Reduces 25,000 Features to Fewer than 1,000 Unique Metabolites,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 19, pp. 10397–10406, Oct. 2017.
- [274] W. A. Scott, J. M. Zrike, A. L. Hamill, J. Kempe, and Z. A. Cohn, “Regulation of arachidonic acid metabolites in macrophages,” *J. Exp. Med.*, vol. 152, no. 2, pp. 324–335, Aug. 1980.
- [275] J. W. Ashley *et al.*, “Polarization of Macrophages toward M2 Phenotype Is Favored by Reduction in iPLA2 $\beta$  (Group VIA Phospholipase A2),” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 44, pp. 23268–23281, Oct. 2016.
- [276] C. A. Sorgi *et al.*, “Dormant 5-lipoxygenase in inflammatory macrophages is triggered by exogenous arachidonic acid,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 10981, Sep. 2017.
- [277] S. E. Wenzel, “Arachidonic acid metabolites: mediators of inflammation in asthma,” *Pharmacotherapy*, vol. 17, no. 1 Pt 2, pp. 3S-12S, Feb. 1997.
- [278] J. J. Laskin and A. B. Sandler, “The importance of the eicosanoid pathway in lung cancer,” *Lung Cancer*, vol. 41, pp. 73–79, Aug. 2003.
- [279] T. Hida *et al.*, “Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas,” *Cancer Res.*, vol. 58, no. 17, pp. 3761–3764, Sep. 1998.
- [280] R. N. Gomes, S. Felipe da Costa, and A. Colquhoun, “Eicosanoids and cancer,” *Clinics*, vol. 73, no. Suppl 1, 2018.
- [281] K. Jandl *et al.*, “Activated prostaglandin D2 receptors on macrophages enhance neutrophil recruitment into the lung,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 137, no. 3, pp. 833–843, Mar. 2016.
- [282] A. P. Van der Leek, Y. Yanishevsky, and A. L. Kozyrskyj, “The Kynurenine Pathway As a Novel Link between Allergy and the Gut Microbiome,” *Front. Immunol.*, vol. 8, 2017.
- [283] F. Ajamian *et al.*, “Respiratory syncytial virus induces indoleamine 2,3-dioxygenase activity: a potential novel role in the development of allergic disease,” *Clin. Exp. Allergy*, vol. 45, no. 3, pp. 644–659, 2015.
- [284] Y.-H. Shi and W.-G. Fang, “Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, no. 8, pp. 1082–1087, Apr. 2004.
- [285] A. Palazon, A. W. Goldrath, V. Nizet, and R. S. Johnson, “HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity,” *Immunity*, vol. 41, no. 4, pp. 518–528, Oct. 2014.
- [286] A. J. Byrne, S. A. Mathie, L. G. Gregory, and C. M. Lloyd, “Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways,” *Thorax*, vol. 70, no. 12, pp. 1189–1196, Dec. 2015.

**Titre :** Étude métabolomique de la polarisation des macrophages pulmonaires humains

**Mots clés :** Macrophages pulmonaires, métabolomique, oxystérols, spectrométrie de masse

Les macrophages pulmonaires sont des cellules immunitaires essentielles pour la défense contre les agents pathogènes qui colonisent les voies respiratoires et sont aussi impliqués dans la physiopathologie des maladies pulmonaires inflammatoires telles que l'asthme. Les macrophages peuvent être sujets à une polarisation vers deux phénotypes appelés M1 et M2. Le phénotype M1 est induit par les agonistes des Toll-like Récepteurs et promeut la réponse inflammatoire tandis que le phénotype M2 est induit par les cytokines Th2 canoniques IL-4 et IL-13 et exerce principalement des fonctions immunorégulatrices. Cette différenciation se traduit par des modifications du phénotype (expression de protéines de membrane, production de cytokines) et des fonctions cellulaires. La polarisation a aussi un impact sur le métabolisme et la production de médiateurs intracellulaires.

Notre objectif était de caractériser les altérations métabolomiques survenant au cours de la polarisation M1/M2 de macrophages pulmonaires humains. Dans un premier temps, des méthodes métabolomiques non-ciblées et ciblées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont été développées. Ces approches ont ensuite permis d'identifier des voies métaboliques altérées au cours de la polarisation M1/M2 (cycle de Krebs, voie des kynurénines et de l'acide arachidonique) et de quantifier les médiateurs impliqués dans la régulation de la réaction inflammatoire, dont les oxystérols. Ces travaux permettent une meilleure compréhension du métabolisme cellulaire au cours de la polarisation des macrophages pulmonaires humains.

**Title :** Human lung macrophage polarization: a metabolomics study

**Keywords :** macrophages, metabolomics, oxysterols, mass spectrometry

**Abstract :** Lung macrophages are essential immune cells for defense against pathogens that colonize the respiratory tract and are also involved in the pathophysiology of inflammatory lung diseases such as asthma. Macrophages can be subject to polarization towards two phenotypes called M1 and M2. The M1 phenotype is induced by Toll-like Receptor agonists and promotes the inflammatory response while the M2 phenotype is induced by the canonical Th2 cytokines IL-4 and IL-13 and mainly performs immunoregulatory functions. This differentiation results in changes in phenotype (expression of membrane proteins, production of cytokines) and cellular functions. Polarization also has an impact on metabolism and the production of intracellular mediators.

Our objective was to characterize the metabolomic alterations occurring during the M1/M2 polarization in human lung macrophages. Initially, non-targeted and targeted metabolomic methods by liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry and gas chromatography coupled with mass spectrometry were developed. These approaches were then applied to identify altered metabolic pathways during M1/M2 polarization (Krebs cycle, kynurenin and arachidonic acid pathways) and to quantify the mediators involved in regulating the inflammatory response, including oxysterols. This work provides a better understanding of cellular metabolism during the polarization of human lung macrophages.

