



**HAL**  
open science

# Rôle de la protéine HMGB1 dérivée des macrophages au cours d'une réaction inflammatoire

Enzo Piccolo

## ► To cite this version:

Enzo Piccolo. Rôle de la protéine HMGB1 dérivée des macrophages au cours d'une réaction inflammatoire. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30035 . tel-03332139

**HAL Id: tel-03332139**

**<https://theses.hal.science/tel-03332139v1>**

Submitted on 2 Sep 2021

**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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Enzo PICCOLO**

Le 4 mai 2021

**Rôle de la protéine HMGB1 dérivée des macrophages au cours  
d'une réaction inflammatoire**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

**RESTORE**

Thèse dirigée par

**Philippe VALET et Jean-Philippe PRADERE**

Jury

**Mme Florence APPARAILLY, Rapporteur**

**M. Laurent YVAN-CHARVET, Rapporteur**

**M. Bruno SEGUI, Examineur**

**M. Jean-philippe PRADERE, Co-directeur de thèse**

Nous les gueux nous les peu nous les rien nous les chiens nous les maigres nous les Nègre.

Qu'attendons-nous les gueux les peu les rien les chiens les maigres les Nègres  
pour jouer aux fous pisser un coup tout à l'envi contre la vie stupide et bête qui nous est faite.

**Léon Gontran Damas (1912-1978)**

La nuit je mens  
Je prends des trains à travers la plaine  
La nuit je mens  
Je m'en lave les mains  
J'ai dans les bottes des montagnes de questions  
Où subsiste encore ton écho  
Où subsiste encore ton écho

**Alain Bashung (1947 -2009)**

“Je me rendais compte que ma voix retenait l'attention, qu'elle faisait vibrer et apportait des parcelles  
de bonheur”

**Cesaria Evora (1941-2011)**

«À vaincre sans péril, on triomphe sans gloire.

## REMERCIEMENT

Pour commencer je souhaite remercier le Pr. Bruno Segui, pour avoir présidé mon jury de thèse. Je remercie chaleureusement les Pr. Florence Apparailly et Pr. Laurent Yvan Charvet pour leur évaluation et analyses en tant que rapporteurs, sur mon travail de thèse.

Ensuite je souhaite remercier mon équipe d'accueil. Adipolab ou Metabolink son nom importe peu, sa qualité ne dépend pas de son appellation. Dans la très grande majorité je suis venu au labo avec l'envie, et c'est en partie dû à la façon dont elle est dirigée, et les valeurs qu'elle défend. Dans tous les cas, je remercie les Pr. Philippe Valet, Dr. Cédric Dray et Dr. Armelle Yart pour la direction de cette équipe qui fut le théâtre de ma thèse.

Philippe est depuis ma L1 un professeur qui a éveillé en moi le goût de la physiologie et pour cela je vous remercie. Durant mon cursus à l'université Paul Sabatier j'ai croisé différents enseignants, qui m'ont instruits, et transmis le plaisir de la biologie : Isabelle Castan, Cedric Dray, Pascale Dufourcq, Virginie Bourlier pour cela je vous remercie.

J'ai souvent comparé la structure d'une équipe de recherche à une grande famille (la comparaison n'engage que moi). Étrange à première vue, néanmoins certaines similitudes sont réelles.

Dans toutes les familles il y a les aînés, qui connaissent tout le monde, tous les labos, toutes les querelles : Philippe et Isabelle. Il y a aussi les oncles et tantes qui nous connaissent depuis le début et qui nous ont vus grandir : Armelle, Cedric, Sophie LeGo. Dans cette famille laborantine il y a aussi les cousins de mon âge, avec qui on partage des expériences et des soucis, Jean, Romain, Gwendoline, Deborah, Godeffroy et Mouna ou encore les grandes cousines Celine, Veronika, Mylène, Aurelie Sophie Bonnel qu'on imite. D'autre part dans cette famille on retrouve aussi les petites cousines (Ophélie, Nancy, Alizée, Vanessa, Johanna, Marie) qui nous accompagnent et aident dans notre développement. Enfin, il y a aussi les « frère et sœurs » les thésard(e)s, avec qui on partage le plus.

C'est ainsi que j'ai rencontré d'autres membres de cette « famille ». Ce sont nos pioupiou, Marie Catenacci (KT), Clémence Tropis (Clem), puis on a vu Elena Morin (Momo), et enfin Laurène Mazeyrie. Ainsi j'ai le sentiment que l'on est tous, dans la même grande fratrie des Thésards de l'équipe. On se connaît bien tous les cinq. Les regards en disent long. On s'est apprivoisé, on s'écoute, et on se soutient. Depuis ces quatre dernières années, c'est avec vous que j'ai passé le plus de temps (ok on bosse beaucoup, mais j'ai eu de la chance d'être en votre agréable compagnie). Nous avons aussi passé du bon temps (GinTo-time et les brunchs savoureux, quelques soirées alcoolisées). Dans un autre registre je me souviens aussi des goûters à 18 heures, en mode au bout du Wok avec des biscuits au Nutella ou des M&M's afin d'éponger nos échecs ou résultats « qui ne vont pas dans le bon sens ». A vous toutes je vous souhaite de continuer « à faire ». Faire de votre mieux et de vous dépasser chaque fois, afin de ne rien regretter.

Dans ces remerciements je n'ai pas encore parlé de la façon dont je suis arrivé dans cette « famille scientifique ». Je suis arrivé dans cette équipe, après un entretien avec le Dr Jean-Philippe Parèdre (ou JP). JP m'a appris la stabilité émotionnelle, la rigueur scientifique, l'abnégation, l'humilité, la disponibilité. Il fait partie de ceux qui brûlent pour la Science, de ceux qui cherchent toujours le coup d'après et cherchent à se dépasser. Le métier de chercheur est un métier qui demande à l'Homme choisi d'être accompli en tout point (ce qui est impossible certe). Néanmoins, le chercheur doit se tenir droit sur ses appuis et sa connaissance. Il doit savoir gérer l'échec, ainsi que la ressource humaine, le temps, les expériences, les souris (merci aux 1300 souris qui ont contribué à ce projet). Pour un chercheur sa créativité, la littérature scientifique, son « Gut feeling » sont ses moteurs pour émettre l'hypothèse que... la suite se décline à l'infinie.

Le chercheur doit être organisé, novateur, consciencieux, curieux, structuré, humble, et efficace. JP m'a montré comment il était (et plutôt doué) dans tous ces domaines. C'est un métier à plein temps, les soirs, les weekends, les vacances. J'ai conscience de cela à présent. Par la suite je vais porter haut et fier ces valeurs, JP. Merci d'avoir cru en moi. Je n'ai pas la prétention que ma thèse va changer la face du monde, mais ce qui est sûr c'est qu'elle a changé mon monde.

Ce format un peu particulier de remerciement, est la façon la plus évidente que j'ai trouvé pour vous remercier tous. Avec vous tous j'emporte avec moi à Chicago des souvenirs, discussions, secrets, verre

de vins, Ginto, voyage, révélations, expériences et histoires (d'humain et ou de biologie). Pour tout cela je me dis heureux d'avoir été à vos côtés.

Tout dernièrement cette famille scientifique s'est agrandie. On est devenu un nouveau centre, un jeune centre, Restore. J'y ai rencontré d'autres familles, des visages connus et d'autres inconnues, mais tout souriant, aidant, et curieux. Je vous souhaite à tous des vents favorables, et que la flamme brûle.

Dans ma vie hors du laboratoire je souhaite aussi remercier mes amies. Je remercie Camille (Marnette), Doriane (Dod), Kim (Kimmy), Pauline, Purple, Ornella, Pierre, Amy-Marie et ma Marie. Je vous remercie d'avoir été à mes côtés. Ma belle Marie, je sais qu'on se reverra aux USA ! Boston Chicago ce n'est pas très loin.

Pour finir, je remercie mes parents, mon père, le Dr. Didier Piccolo, ma mère Nathalie Blondeau, ma sœur Manon Piccolo, mon frère Matys Piccolo, et Marie Dulciste. A vous et pour vous, mes premiers liens d'Amour, et ce manuscrit.

## Résumé

La réaction inflammatoire est la première étape nécessaire pour restaurer l'homéostasie tissulaire lésée. Elle implique au cours de ses différentes étapes, le système immunitaire, notamment les macrophages qui présentent alors divers remaniements inflammatoires et métaboliques. Les macrophages sont capables de modifier et d'adapter leur métabolisme cellulaire afin de satisfaire leurs besoins énergétiques et réaliser de façon efficace la réaction inflammatoire en fonction des signaux du milieu environnant. Ces adaptations métaboliques influencent la physiologie des mitochondries et les oxydations phosphorylantes (OXPHOS), les sécrétions de molécules pro- et anti-inflammatoires, ainsi que la capacité à réaliser la phagocytose (pathogènes, débris cellulaire, autophagie) dépendante de la physiologie des lysosomes. Ces adaptations métaboliques sont sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcriptions comme NFκB, TFEB ou HIF1α. La compaction et l'accessibilité de la chromatine sont des éléments cruciaux pour la régulation indirecte de l'activité de ces facteurs de transcription. Dans le noyau, la compaction de l'ADN est régulée par les histones mais aussi par d'autres protéines de la famille des High Mobility Group (HMG). Parmi les protéines HMG, la protéine High Mobility Group B1 (HMGB1) principalement localisée dans le noyau est capable de réguler de façon indirecte la transcription de gènes dans de nombreux tissus. En plus de son rôle nucléaire, HMGB1 peut être activement relocalisé dans le cytoplasme puis sécrété par les cellules de l'immunité innée au cours d'inflammation aiguë ou chronique. Une fois dans la circulation sanguine HMGB1 joue le rôle d'alarmine qui initie et maintient l'inflammation. De plus, chez la souris au cours d'une inflammation aiguë ou chronique les concentrations d'HMGB1 circulant sont augmentées par rapport à la condition basale. Tous ces résultats suggèrent un rôle d'HMGB1 dans l'immunométabolisme des macrophages ainsi que dans les processus inflammatoires aigus ou chroniques. Dans ce contexte, ce travail de thèse s'articule autour de deux objectifs : I/: Étudier le rôle d'HMGB1 dérivé des macrophages et de ses conséquences sur la survenue de la fibrose. II/: Étudier le rôle intracellulaire d'HMGB1 dérivé des macrophages au cours du choc inflammatoire aigu. Ces travaux ont permis de démontrer *in vitro* et *in vivo* qu'en tant qu'alarmine HMGB1 dérivé des macrophages n'a pas d'influence sur la survenue de la fibrose suite à une nécro-inflammation chronique. De plus, ces travaux ont permis de démontrer *in vitro* et *in vivo* qu'en tant que facteur nucléaire, HMGB1 exerce un puissant effet anti-inflammatoire en favorisant la polarisation de type M2, en jouant notamment sur la biogénèse et la fonction des lysosomes. Tous ces résultats pris ensemble ont permis de mieux caractériser et comprendre les fonctions biologiques de la protéine HMGB1 dérivée des macrophages au cours du choc inflammatoire aigu. Ce travail permet aussi de mieux envisager des approches thérapeutiques autour de la fonction d'HMGB1 afin d'éviter toute hyper-réaction inflammatoire aux effets délétères pour l'organisme chez des patients atteints de pathologies inflammatoires aiguës/chroniques.

## Abstract

The Inflammatory reaction is the first necessary step to combat all pathogens and tissue injuries and restore damaged tissue homeostasis. The immune system is particularly involved during each step, in particular the macrophages which display various inflammatory and metabolic changes. Macrophages can modify and adapt their cellular metabolism to meet their energy needs and efficiently perform the inflammatory reaction according to signals from the surrounding environment. These deep metabolic adaptations influence mitochondria physiology and oxidative phosphorylations (OXPHOS), the secretions of pro and anti-inflammatory molecules, as well as the ability to phagocytize various inflammatory compounds (pathogens, cell debris, and autophagy). These deep metabolic adaptations are under the control of several transcription factors such as NF $\kappa$ B, TFEB or HIF1 $\alpha$ . The compaction and accessibility of chromatin are crucial for the regulation of the activity of these transcription factors. In the nucleus, DNA compaction is regulated by histones but also by High Mobility Group (HMG) proteins. Among this family of HMG proteins, the High Mobility Group B1 (HMGB1) protein, mainly located in the nucleus, is capable of regulating indirectly the transcription of genes in many tissues. In addition to its nuclear role, HMGB1 can be actively relocated into the cytoplasm and then secreted by innate immune cells during acute or chronic inflammation. Once in the bloodstream, HMGB1 acts as alarmin which initiates and maintains inflammation. Furthermore, during acute or chronic inflammation, concentrations of circulating HMGB1 are increased compared to the basal condition in mice. All these results suggest a role of HMGB1 in the immunometabolism of macrophages as well as in acute or chronic inflammatory processes. In this context, this thesis work has two objectives: I /: To study the role of HMGB1 derived from macrophages and its consequences on the occurrence of tissue fibrosis. II /: To study the intracellular role of HMGB1 derived from macrophages during acute inflammatory shock. This work has demonstrated *in vitro* and *in vivo* that, as an alarmin HMGB1 derived from macrophages, does not influence the occurrence of fibrosis following chronic inflammation. Moreover, we demonstrated *in vitro* and *in vivo* that as a nuclear factor HMGB1 exerts a potent anti-inflammatory action on macrophages by regulating lysosome biogenesis and function and skewing towards a M2 profile. All these results taken together helped to better characterize and understand the biological functions of HMGB1 proteins during the inflammatory reaction. Boosting these anti-inflammatory functions of HMGB1 may constitute a potential therapeutic approach to counteract the deleterious effect of hyperinflammation in patients with acute/chronic inflammatory diseases.

## Table des figures

Figure 1: L'arbre hématopoïétique

Figure 2 : La balance de dégradation après phagocytose

Figure 3 : HAUT: Initiation et activation de l'inflammasome NLRP3 et Caspase 1

Figure 3 : BAS | Les effecteurs de la Caspase 1

Figure 4: La voie cGAS-STING et la détection de l'ADN cytosolique

Figure 5 : Régulation de l'inflammation et la cicatrisation par différentes classes de macrophages

Figure 6: La polarisation des macrophages détermine leur capacité d'efférocytose

Figure 7 : exemple de régénération chez les urodèles

Figure 8 : Balance entre la régénération et la fibrose

Figure 9 : Altération de la capacité du tissu à retourner à l'homéostasie par la fréquence des lésions

Figure 10 : Effet délétère d'une overdose d'APAP sur la mitochondrie des hépatocytes

Figure 11 : Cinétique de la réponse immune lors d'un sepsis

Figure 12 : Transition levure-hyphes et extension de la membrane du phagosome

Figure 13 : La phagocytose orchestre diverses fonctions essentielles du macrophage

Figure 14 : Modèle intégratif et multidimensionnel de l'origine embryonnaire des macrophages

Figure 15 : Le *Continuum* des polarisations des macrophages

Figure 16 : Évolution du dogme des polarisations des macrophages

Figure 17 : Illustration de l'hétérogénéité des macrophages *in vivo*; *in vitro* au niveau cellulaire

Figure 18 : Le microenvironnement façonne les macrophages

Figure 19 : Évolution de la proportion des articles publiés depuis 1980 à janvier 2016 en rapport avec divers composants cellulaires

Figure 20 : Représentation d'une mitochondrie

Figure 21 : Représentation de l'évolution du modèle de distribution du potentiel de membrane dans une mitochondrie

Figure 22 : Illustration des différents complexes, qui forme la CTE et les OXPHOS

Figure 23 : Le CK (un hub métabolique) connecté à la CTE dans la matrice de la mitochondrie



Figure 24 : (Gauche) Les signaux dépendants de la mitochondrie

Figure 24 (Droite) : les signaux dépendant du CK

Figure 25 : Schéma de l'adaptation métabolique dans le macrophage M1

Figure 26 : La glycolyse, l'entrée du Cycle de Krebs, leurs inhibiteurs et conséquences biologiques

Figure 27 : Le métabolisme des M1 présente un Cycle de Krebs "brisé" pour initier et amplifier l'inflammation

Figure 28 : Schéma de la production de ROSm des M1

Figure 29 : La Génération de ROS par la NADPH-Oxydase

Figure 30 : Le métabolisme de l'arginine dans le macrophage M1 vs M2

Figure 31 : Le catabolisme lipidique des macrophages M2

Figure 32 : Le transport des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie

Figure 33: Les fonctions des protéines membranaires du lysosome

Figure 34: La voie de présentation du CMH de classe II mature à la membrane plasmique

Figure 35: Le lysosome est un organe important dans la signalisation intracellulaire

Figure 36: La pompe v-ATPase, une plateforme pour le métabolisme du macrophage

Figure 37: Vision schématique de la v-ATPase

Figure 38: régulation du FdT TFEB par la détection des nutriments et le complexe mTORC1

Figure 39: Rôle du FdT HIF1 $\alpha$  dans la polarisation M1 du macrophage au cours de la réponse inflammatoire

Figure 40: Les signaux et régulation des facteurs de transcription dans la polarisation des macrophages M1 et M2

Figure 41 : Bilan des modifications post-traductionnelles d'HMGB1

Figure 42 : Rôles d'HMGB1 sur l'autophagie et mitophagie

Figure 43 : Rôles d'HMGB1 dans l'efférocytose

Figure 44: Graphique représentant les rôles antagonistes d'HMGB1 en fonction de sa localisation subcellulaire

Figure 45 Mécanisme possible du phénotype inflammatoire du HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup>

Figure 46 : Heatmap comparant la quantité des métabolites intracellulaires chez les BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> en condition de croissance

Figure 47: Les variants du gènes d'*Hmgb1* chez l'Homme

## Abréviations

2DG : 2-Deoxy-D-glucose

### A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNm : Acide désoxyribonucléique mitochondrial

ADNn : Acide désoxyribonucléique nucléaire

AG : Acide Gras

ALT : Alanine aminotransférase

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

AMs : Macrophages Alvéolaires

APAP : Acétaminophène

AST : Aspartate transaminase

ATM : Adipose Tissue Macrophages

ATP: Adenosine triphosphate

### B

BMDM: Bone Marrow Derived Macrophage

### C

cGAMP : Cyclic GMP-AMP

CK : Cellule de Kupffer

CLP : Cecum Ligature Punction

CMH.II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

### D

DAMPs: Damage-associated molecular patterns

DCs: Cellules Dendritiques

DILI: Drug Induced Liver Injury

### E

EP: Ethyl Pyruvate

### F

FAO: Fatty Acid Oxidation

FdT : Facteur de Transcription

### G

G6P: Glucose-6-Phosphate

GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor

### H

HAT: Histones-Acetyl-Transferase

HFD: High Fat Diet

HIF1: Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HMGB1: High Mobility Group B1

### I

ICM: inflachromènes

IDH: isocitrate déshydrogénase

IMS: Espace InterMembranaire

INF- $\gamma$  : Interféron-  $\gamma$

IL-6 : Interleukine 6

IL-1 $\beta$  : Interleukine 1 $\beta$

IL-10 : Interleukine 10

### J

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

### K

### L

LAMPs: Lifestyle-associated molecular patterns

LES : Lupus Érythémateux Systémique

LPS : Lipopolysaccharide

LSD: Lysosomal Storage Diseases

LXRs: Liver X receptor

### M

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts

MerTK: Récepteur Mer Tyrosine Kinase

MMe: Macrophages Metabolically-activated

mTOR: mammalian Target Of Rapamycine

mTROC1: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

mTROC2: mammalian Target Of Rapamycin Complex 2

## **N**

NAC: N-Acétylcystéine

NASH: NonAlcoholic SteatoHepatitis

NES: Nuclear Export Signal

NFκB: nuclear factor-kappa B

NO: Monoxyde d'Azote

Nrf2 = NFE2L2 « Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 »

## **O**

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anions superoxyde

## **P**

PAMPs: Pathogen Associated Molecular Patterns

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PGC1 α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PPARγ: peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PPP: XXX

PRRs: Pattern recognition receptors

## **Q**

## **R**

RE: Reticulum Endoplasmique

RET: Reverse Electron Transfer

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

ROSm: Mitochondrial Reactive Oxygen Species

## **S**

SI : Système Immunitaire

SIA: Système Immunitaire Adaptatif

SII: Système Immunitaire Innée

SODs : superoxyde dismutase

Le SVF : Sérum de Veau Fœtal

La SVF : Fraction Vasculaire du Stroma

## **T**

TAM: Tumor Associated Macrophages

FTEB: Transcription factor EB

TG: TriGlycérides

Th 1: Lymphocyte T helper 1

Th 2: Lymphocyte T helper 2

TLR: Toll Like Receptor

TNFα: Tumor Necrosis Factor α

TNF β: Tumor Necrosis Factor β

TSC: Tuberous Sclerosis Complex

## **U**

## **V**

VDAC: Voltage-dependent anion channel

## **W**

WT: Wild Type

## **X**

## **Y**

## **Z**

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>13</b>
<b>A. GENERALITES.....</b>	<b>13</b>
I. <i>Historique : Les 5 points cardinaux de l'inflammation.....</i>	13
1. Évolution de la définition de l'inflammation jusqu'à nos jours .....	13
II. <i>Le système immunitaire.....</i>	13
1. Le système immunitaire innée .....	13
a. Le système immunitaire adaptatif.....	16
III. <i>La réaction inflammatoire .....</i>	16
1. Étape 1 : Initiation de la réponse inflammatoire.....	16
2. Étape 2 : Amplification de la réaction.....	17
3. Étape 3 : Résolution de l'inflammation.....	19
4. Étape 4 : Le retour de l'homéostasie par les macrophages.....	21
IV. <i>Rôle des macrophages dans la fibrose et la régénération .....</i>	22
1. La régénération .....	22
2. La fibrose .....	23
V. <i>Les effets négatifs de l'inflammation.....</i>	26
1. L'origine de l'inflammation médiée par les DAMPs et les LAMPs .....	26
1.1. L'inflammation stérile : le cas de l'insuffisance hépatique.....	26
Le métabolisme de l'APAP dans l'hépatocyte et synthèse de NAPQI.....	27
Les cibles du NAPQI .....	27
Mode d'action du NAPQI et la survenue du DILI .....	28
VI. <i>L'inflammation infectieuse et septicémie .....</i>	30
1. Le choc septique .....	30
Les causes .....	31
Les symptômes inflammatoires : la tempête cytokinique.....	31
Les symptômes de l'immunosuppression.....	31
Le cas d'un sepsis par la levure <i>Candida Albicans</i> .....	32
2. Les traitements du choc septique .....	34
<b>B. ORIGINES, DIVERSITE ET LOCALISATION DES MACROPHAGES.....</b>	<b>35</b>
I. <i>Ontogénie, diversité et localisation.....</i>	35
1. Ontogénie et hétérogénéité des populations de macrophages .....	35
2. Diversité et fonctionnalité des macrophages.....	36
II. <i>La polarisation des macrophages .....</i>	37
1. L'impact de l'environnement.....	39
<b>C. LA MITOCHONDRIE : UN ORGANITE CENTRAL DANS LA DESTINEE DU MACROPHAGE.....</b>	<b>40</b>
I. <i>Origine et composition.....</i>	41
1. Structure des mitochondries.....	42
1.1. La membrane mitochondriale externe (MME) .....	43
1.2. La membrane mitochondriale interne (MMI) .....	43
1.3. L'espace inter-membranaire .....	43
1.4. La matrice mitochondriale.....	44
II. <i>Le fonctionnement et production d'énergie par la mitochondrie.....</i>	44
1. Les complexes mitochondriaux.....	44
1.1. Le cycle de Krebs .....	46
III. <i>Le rôle de la mitochondrie dans l'immunologie .....</i>	47
<b>D. L'IMMUNOMETABOLISME DES MACROPHAGES .....</b>	<b>47</b>
I. <i>Le métabolisme au cours de la polarisation M1 .....</i>	48
1. Le catabolisme du glucose dans le M1.....	49
1.1. La glycolyse et l'effet Warburg au cours de la polarisation vers le M1.....	49
Les effets Warburg.....	49
Les cibles pharmacologiques et leurs effets sur la glycolyse .....	49
2. Le CK et ses métabolites lors de la polarisation M1 .....	51
2.1. Les métabolites du CK au sein du macrophage M1.....	53
Le citrate et l'Acétyl-CoA.....	53
L' $\alpha$ céto-glutarate .....	53
Le succinate .....	54
Le fumarate .....	55
L'itaconate .....	55
2.2. Les ROSm au sein des macrophages M1.....	56
Les ROS mitochondriaux.....	56
Les ROS membranaires (NADPH-Oxydase).....	57

3.	Le rôle du calcium au sein du macrophage M1 .....	58
4.	Le rôle du NO au sein du macrophage M1 .....	59
II.	<i>Le métabolisme lors de la polarisation M2</i> .....	60
1.	Rôle des glucocorticoïdes .....	61
2.	Rôle du tryptophane et de la Kynurénine.....	61
3.	Le catabolisme des lipides dans le M2.....	62
3.1.	L'entrée des lipides dans le macrophage .....	63
	Les lipides : substrats essentiels du M2.....	64
3.2.	Controverse autour du rôle des AG dans la polarisation M2 .....	64
E.	<b>LA FONCTION BIOLOGIQUE DES LYSOSOMES DANS L'IMMUNITE ET LE METABOLISME</b> .....	65
I.	<i>Les maladies liées aux lysosomes</i> .....	66
II.	<i>Le lysosome : un carrefour entre la nutrition et l'immunité (mTOR)</i> .....	68
III.	<i>L'acidification du lysosome est un élément central dans la physiologie du macrophage</i> .....	70
IV.	<i>Le facteur de transcription lysosomal TFEB</i> .....	71
F.	<b>LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION</b> .....	74
I.	<i>Les facteurs de transcription de la polarisation M1</i> .....	74
II.	<i>Les facteurs de transcription de la polarisation M2</i> .....	75
G.	<b>HMG (HMG PROTEINES ET SA FAMILLE)</b> .....	78
I.	<i>Structure de la super famille des protéines d'HMG</i> .....	78
1.	HMGBA (A/T hook Motif).....	78
2.	HMGN (Nucleosomale Binding Domain (NBD)).....	78
3.	HMGB (MBG-box) .....	79
3.1	HMGB2, HMGB3, HMGB4 .....	79
III.	<i>HMGB1</i> .....	79
1.	La structure moléculaire.....	79
2.	Les modifications post-traductionnelles d'HMGB1.....	80
2.1.	La méthylation.....	80
2.2.	La phosphorylation.....	80
2.3.	La glycosylation et l'ADP-ribosylation.....	81
2.4.	L'acétylation.....	81
3.	Le rôle nucléaire .....	81
4.	Le rôle cytoplasmique et extracellulaire .....	82
4.1.	La sécrétion d'HMGB1 .....	82
4.2.	HMGB1 active les cellules immunitaires .....	83
4.3.	HMGB1 fait partie du SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) .....	84
4.4.	HMGB1 et son rôle dans l'autophagie/mitophagie.....	84
4.5.	HMGB1 et son rôle dans le macrophage.....	86
4.6.	HMGB1 protège d'une sur-inflammation lors d'une infection bactérienne.....	87
4.7.	HMGB1 et la phagocytose dans le macrophage .....	87
4.8.	Physiopathologie de l'axe HMGB1-Phagocytose.....	88
	<b>OBJECTIF DE THÈSE</b> .....	90
	<b>RÉSULTATS</b> .....	92
	<b>DISCUSSION</b> .....	115
	<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	122
	<b>RÉFÉRENCES</b> .....	127

# INTRODUCTION

## A. Généralités

*Qu'est-ce que l'inflammation ?* L'inflammation est la réponse universelle d'un corps face aux blessures et agressions externes ou internes qu'il peut rencontrer au cours de sa vie. L'inflammation est la première étape qui permet soit de régénérer soit de cicatriser pour assurer la survie. La réaction inflammatoire est basée sur une étroite collaboration entre le système immunitaire inné et adaptatif.

### I. Historique : Les 5 points cardinaux de l'inflammation

L'inflammation est connue depuis l'antiquité ; Aulus Cornelius Celsus l'a décrit comme regroupant une somme de caractéristiques : *rubor* (rougeur), *calor* (chaleur), *tumor* (gonflement), *dolor* (douleur), *functio laesa* (impotence fonctionnelle). Il ne s'agit en réalité que des conséquences, ou dommages collatéraux, de la réaction inflammatoire médiée par le système immunitaire.

#### 1. Évolution de la définition de l'inflammation jusqu'à nos jours

L'inflammation est une suite de réactions d'ordre chimique, humorale, cellulaire, vasculaire, et enfin métabolique. Ces réactions vont, de façon séquentielle, initier des signaux inflammatoires, les amplifier et enfin conduire au retour progressif de l'homéostasie tissulaire.

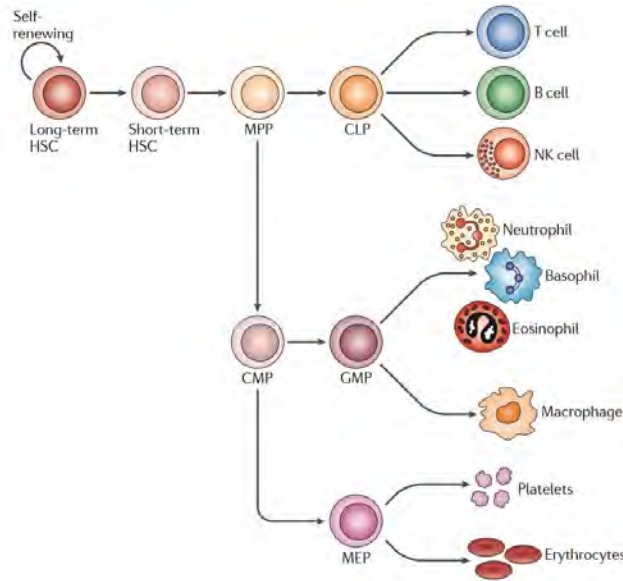
Le système immunitaire fut découvert au XIXe siècle. Il s'agit d'un ensemble dynamique de cellules qui reconnaissent le soi, du non-soi (bactéries, virus, parasites). Ce qui est considéré comme du non-soi est détruit et le soi est conservé. Les cellules du système immunitaire sont appelées leucocytes (du grec *leukos* : blanc et *kutos* : cellule). Le système immunitaire exerce des défenses dites innées et d'autres dites adaptatives. Il est donc très plastique et évolue tout au long de la vie de l'individu.

## II. Le système immunitaire

Le premier système de défense contre l'extérieur, est composé de la peau et des muqueuses, il s'agit d'une barrière physique. Le second système de défense provient des leucocytes, et notamment de la lignée myéloïde du système immunitaire, qui en général, est impliquée dans des réponses immunitaires dites innées. Ce système immunitaire est dit inné puisque nous naissons avec ce panel de cellules et il n'évoluera que très modérément tout au long de la vie. Le troisième système de défense provient de la lignée lymphoïde du système immunitaire, qui constitue la partie des réponses immunitaires dites acquises ou adaptatives. Ces deux systèmes immunitaires sont étroitement interconnectés et communiquent en permanence. L'ensemble des leucocytes, chez l'Homme adulte provient en condition physiologique de la moelle osseuse, présente dans les os creux et plat (**Voir figure 1**).

### 1. Le système immunitaire innée

Il s'agit de la première ligne de défense de l'organisme. Elle permet une protection immédiate et à large spectre de l'organisme vis-à-vis du non-soi et du soi. Il détecte le non-soi par la reconnaissance de structures communes et conservées entre différents pathogènes. Le système immunitaire inné est constitué des cellules dites myéloïdes. Elles participent à l'élimination du pathogène, l'initiation et le maintien de la réponse inflammatoire, et enfin à la mise en alerte du système immunitaire adaptatif. Nous distinguons deux populations de cellules myéloïdes, en fonction de leur localisation. Celles circulant en permanence dans le sang et celles résidant dans les différents tissus de l'organisme.



**Figure 1: L'arbre hématopoïétique.** Le développement des cellules sanguines se différencie à partir d'une cellule souche hématopoïétique dite « long-term » (HSCs) qui a la capacité de se diviser afin de s'auto-renouveler tout au long de la vie, tout en donnant toutes les cellules de la moelle osseuse et du sang. D'autres progéniteurs pluripotents, les « short-term » HSCs et les progéniteurs multipotents (MPPs) ont moins la capacité de réaliser leur auto-renouvellement. Ensemble, ces trois types de cellules constituent les cellules hématopoïétiques et progéniteurs (HSPC). Les MPPs se différencient en deux catégories hématopoïétiques, les progéniteurs lymphoïdes communs (CLPs) et les progéniteurs myéloïdes communs (CMPs). Les cellules sanguines matures sont issues de ces deux types de progéniteurs. Abréviations : progéniteurs des macrophages et granulocytes (GMP), progéniteurs des mégacaryocytes et érythrocytes (MEP), natural killer (NK). Extrait de la revue de Katherine Y. King et Margaret A. Goodell. (Houston - Texas)

Parmi les cellules myéloïdes résidentes nous retrouvons :

- **Les mastocytes**, présents dans les muqueuses ils participent à la réponse inflammatoire par la libération de granules contenant de l'histamine et de l'héparine permettant une vasodilatation et une chemoattraction des macrophages et neutrophiles, sur le site inflammatoire.
- **Les cellules dendritiques (DCs)** sont souvent les premières cellules exposées à l'environnement extérieur. Leur rôle principal est de lier le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif, par la présentation d'antigènes. Pour ce faire, après leur activation et la phagocytose du pathogène, les cellules dendritiques vont migrer et rejoindre un ganglion lymphatique dans le but de présenter des antigènes (issues de la dégradation du pathogène) aux cellules lymphoïdes (lymphocyte T CD4 naifs) au travers de leur récepteur CMH.II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II).
- **Les macrophages** (du grec *macro-*, gros et *-phagein*, manger), sont des cellules résidentes dans l'ensemble des tissus du corps humain. Ils reconnaissent les pathogènes et peuvent les **phagocyter** afin de les éliminer. Les macrophages produisent une grande variété de cytokines afin de moduler l'inflammation. Ils sont aussi capables de produire des ROS (Reactive Oxygen Species) qui participent à plusieurs niveaux à l'élimination du pathogène. Les macrophages ont un phénotype qui évolue tout au long de la réponse inflammatoire (Soehnlein et Lindbom 2010).

D'autre part, se retrouvent dans le sang :

- **Les (polynucléaires) neutrophiles** présentent dans leur cytoplasme une grande quantité de granules cytotoxiques qu'ils libèrent afin d'éliminer les pathogènes. Ils représentent la plus grande fraction des cellules circulantes. Ces cellules peuvent réaliser la **phagocytose** et le **burst oxydatif** (production rapide et massive de ROS) (Savina et Amigorena 2007).
- **Les basophiles et éosinophiles** présentent eux aussi possèdent des granules cytotoxiques contenant des granzymes et de l'histamine. Ils sont responsables de la libération d'un grand nombre de cytokines inflammatoires, lors de la réaction immunitaire (Soehnlein et Lindbom 2010).

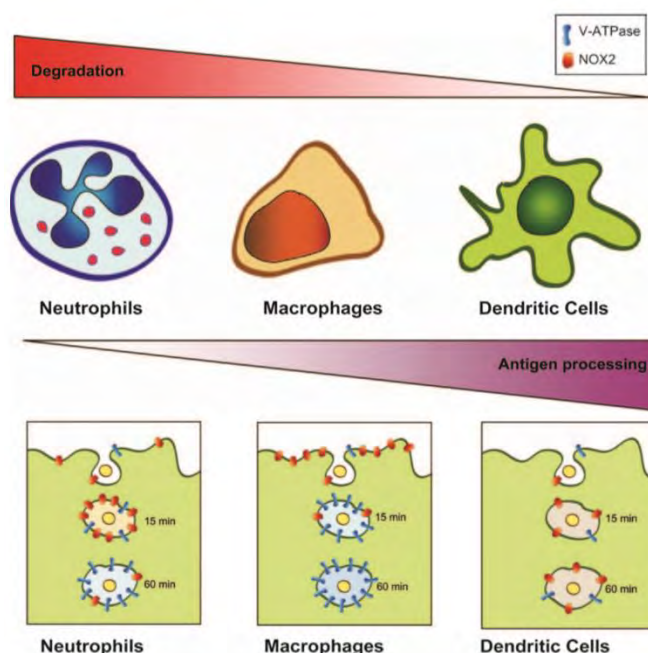
- **Les monocytes** sont des cellules capables de réaliser la **phagocytose**. Ils circulent et patrouillent dans l'ensemble du corps. La biologie du monocyte est complexe, ils peuvent pénétrer les tissus par diapédèse, puis exercer une activité inflammatoire par sécrétion de cytokines telles que le TNF- $\alpha$  ou IL-6 (Krenkel, Mossanen, et Tacke 2014). Dans le foie, ils peuvent acquérir un phénotype proche de celui des « Kupffer Cells » (KC) après diapédèse et différenciation. Les monocytes acquièrent alors sensiblement les mêmes caractéristiques morphologiques et fonctionnelles que les macrophages résidents du tissu infiltré (Scott et al. 2016; Lavin et al. 2014).

J'ai pris le parti de présenter ici une brève introduction de la biologie du macrophage. La question de sa diversité fonctionnelle et métabolique sera abordée dans un second temps à la page 43.

Le Dr Elie Metchnikoff et le Dr. Paul Ehrlich, ont obtenu le prix Nobel de « *médecine ou physiologie* » en 1908 pour la découverte du recrutement au site inflammatoire, et la phagocytose des débris et pathogènes par les cellules du système immunitaire (Gordon 2016; 2008). Le rôle des DCs, des macrophages et neutrophiles découvert en 1908 par le Dr Metchnikoff est aujourd'hui au centre du système immunitaire. Les macrophages et les DCs présentent divers récepteurs comme les TLRs (Toll-like receptors); les PRRs (pattern recognition receptors) et les récepteurs Fc, qui permettent la phagocytose du complexe détecté. La découverte des TLR (par le français Jules Hoffmann, l'américain Bruce Beutler et le canadien Ralph Steinman) fut récompensée par l'obtention d'un prix Nobel « *physiologie et médecine* » en 2011.

L'élimination du pathogène reconnue par ces récepteurs fait intervenir dans les cellules leur activité protéolytique et de présentation d'antigènes (Savina et Amigorena 2007).

Les macrophages et les neutrophiles utilisent la protéolyse pour éliminer les cellules apoptotiques, sénescents et les pathogènes, alors que les DCs participent davantage à la présentation d'antigènes. Dans les deux cas, les complexes protéiques comme la NADPH-oxydase (burst oxydatif) et l'ATPase-Vacuolaire (protéolyse) permettent la dégradation et la présentation du pathogène au reste du système immunitaire (**Voir figure 2**). Ceci afin de produire une réponse immunologique coordonnée entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Il a été rapporté que les neutrophiles sont les cellules myéloïdes avec le phagosome le moins acide (Jankowski, Scott, et Grinstein 2002). Pour deux raisons, la première est que lorsque la NADPH-oxydase est active, la pompe à proton (v-ATPase) voit son activité diminuer. La seconde est qu'au cours de son activité de production de ROS, il y a une fuite de protons au travers de la membrane du phagosome associé une consommation de ces derniers par le système de détoxification des ROS de la cellule elle-même (Jankowski, Scott, et Grinstein 2002).





**Figure 2 : La balance de dégradation après phagocytose :** La régulation du pH et la production de ROS dans le phagosome sont contrôlées par deux complexes multiprotéiques, le NADPH oxydase (NOX2) et l'ATPase Vacuolaire. La forte capacité de dégradation des neutrophiles est essentielle pour l'élimination des pathogènes mais empêche la conservation des peptides du microorganisme. Le recrutement massif de NOX2 au phagosome lors du burst oxydatif provoque la destruction du contenu du phagosome par une importante production de ROS, puis par l'acidification de sa lumière par action de la pompe à proton v-ATPase. Les macrophages, eux, sont à l'équilibre, ils peuvent éliminer le pathogène efficacement et dans certains cas, ils peuvent aussi participer à la présentation d'antigène aux cellules T. Leur burst oxydatif est moins important que les neutrophiles et surtout localisé sur la membrane plasmique. Alors qu'une importante et précoce action de la pompe à proton v-ATPase est observée ce qui induit une forte acidification de la lumière du phagolysosome. Les DCs, à l'inverse, ont une dégradation protéique limitée ce qui préserve l'antigène et permet une présentation optimale des peptides. Dans les DCs un très faible recrutement de NOX2 est observé au phagosome avec une faible action de la pompe à proton v-ATPase ce qui stabilise le pH et permet une conservation des antigènes et une présentation optimale. Issue de la revue d'Ariel Savina et Sebastian Amigorena (Paris – France) (Savina et Amigorena 2007).

### a. Le système immunitaire adaptatif

De façon très brève, le système immunitaire adaptatif protège l'organisme en déclenchant une réponse immunitaire très spécifique qui se met en place après avoir interagi avec le système immunitaire inné. Les lymphocytes naïfs circulent dans l'organisme. Suite à la présentation d'un antigène par la DCs et des signaux de costimulation appropriés, ces lymphocytes s'activent et prolifèrent dans les organes lymphoïdes en différents sous types d'effecteurs (Pearce et al. 2013). Parmi eux, nous observons les Lymphocytes T helper de type 1 (Th1) et de Lymphocytes T helper type 2 (Th2) ou les Lymphocytes T Th17 (Kaiko et al. 2007). Les Th1 libèrent de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\beta$ . Cette cellule est efficace contre les infections intracellulaires et les cellules cancéreuses. Les Th2 libèrent de l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 ce qui active les Lb et participe à l'élimination de parasites. Les Th17 libèrent de l'IL-17, IL-6, IL-22 et TNF $\alpha$  ce qui participe à la réponse inflammatoire et à l'activation des neutrophiles face aux bactéries extracellulaires. De façon large, les Th1 induisent la réponse immune et les Th2 potentialisent la réponse humorale (Kaiko et al. 2007). Les lymphocytes sont aussi capables de réaliser la recombinaison somatique ou V (D) J. Cette dernière aboutit à l'édition de lymphocytes B avec des immunoglobulines spécifiquement sélectionnées pour leur affinité contre un pathogène. Le système immunitaire adaptatif complète la réponse immunitaire innée lors d'une seconde rencontre avec ce même pathogène ce qui complète la réaction inflammatoire.

## III. La réaction inflammatoire

### 1. Étape 1 : Initiation de la réponse inflammatoire

Rapidement après une lésion cutanée, les signes cardinaux de l'inflammation apparaissent. Ils sont : rougeur, chaleur, gonflement, douleur et l'impotence fonctionnelle. L'initiation de la réponse inflammatoire commence par la mise en place d'une vasodilatation de la zone atteinte. Celle-ci est due à la sécrétion de NO et d'histamine par les cellules immunitaires.

L'initiation de la réponse inflammatoire implique les macrophages résidents, les DCs, les mastocytes et les cellules de Langerhans après reconnaissance de motifs du soi appelés DAMPs (Damage-associated molecular patterns) ou des motifs du non-soi nommés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Parmi les DAMPS les plus connus et les mieux caractérisés, nous pouvons citer, S100A Peptides mitochondriaux, heparan sulfate, ATP, ou HMGB1, libérés principalement par les cellules nécrotiques, ils peuvent induire la synthèse de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) (J. Zhang et al. 2017) ; (Bertheloot et Latz 2017). Les cellules myéloïdes vont activer les cellules endothéliales et conduire à leur perméabilisation diminuant ainsi le tonus musculaire de l'artère. Ceci conduit à une diminution du débit sanguin par augmentation du diamètre des vaisseaux. La conséquence physique de cette réaction est la survenue d'un œdème (Hara et al., s. d.). Il s'ensuit une migration par chemoattraction et une diapédèse des neutrophiles puis des monocytes et enfin les lymphocytes sur le site inflammatoire (Soehnlein et Lindbom 2010).

Les neutrophiles arrivent en premier sur le site lésé, ils peuvent libérer activement leur contenu du noyau afin de rapidement « emprisonner » et « signaler » le pathogène. Cette action a été appelée NET (Neutrophile Extracellular Traps) (Soehnlein et Lindbom 2010). Les NETs sont des complexes nucléoprotéiques dont le composant majoritaire est l'ADN, auquel sont associées des protéines des granules neutrophiliques (myéloperoxydase, lactoferrine, gélatinase) ainsi que des histones. Le rôle de ces filets est de piéger les bactéries et les débris cellulaires afin de faciliter leur destruction et leur phagocytose par les autres phagocytes (Brinkmann 2004).

## 2. Étape 2 : Amplification de la réaction

Les cellules immunitaires présentes sur le site reconnaissent les DAMPs et PAMPs via les TLR. Elles synthétisent ainsi des cytokines tels que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  afin d'amplifier la réponse inflammatoire. Cette synthèse entraîne une cascade de signalisation qui aboutit à l'activation d'un complexe moléculaire cytosolique appelé inflammasome.

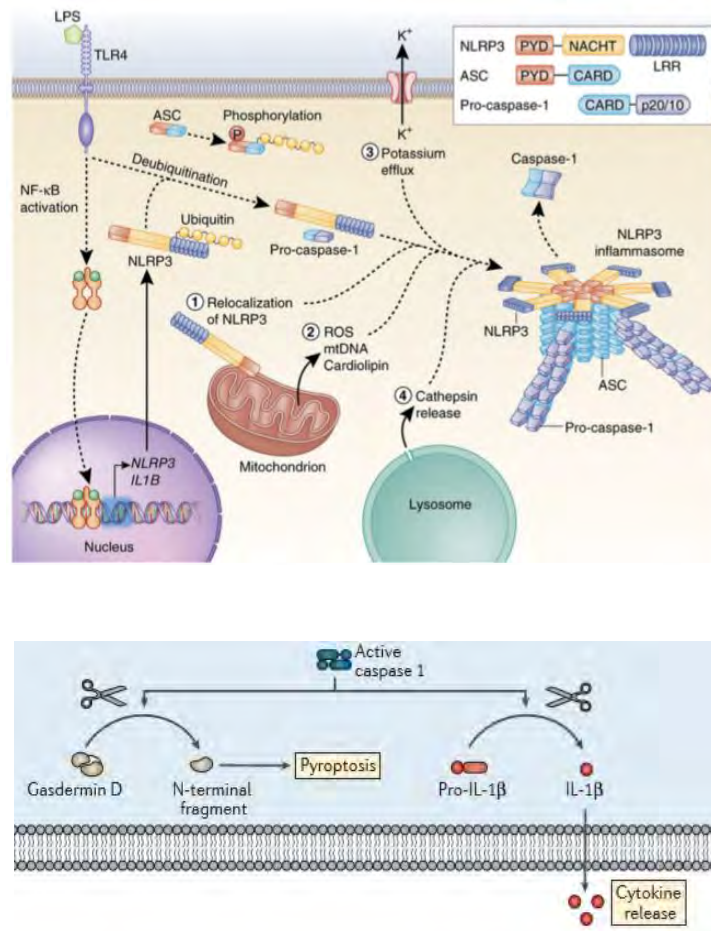
L'inflammasome est composé de différents acteurs (Guo, Callaway, et Ting 2015): NLRP3 (senseurs), ASC (adaptateur) et la pro-caspase 1 (effecteur) (**Voir figure 3**). Après la reconnaissance du pathogène par les TLRs et PRRs les pro-caspases 1 s'oligomérisent et *via* leur activité protéolytique elles s'activent par clivage (Tschopp et Schroder 2010). Ceci active l'inflammasome qui entraîne d'une part la maturation (par clivage) et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 et d'autre part la pyroptose de la cellule. La pyroptose est une mort cellulaire et inflammatoire rapide qui se traduit par une libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 ainsi que l'épanchement du reste du contenu cytoplasmique de la cellule (Guo, Callaway, et Ting 2015). La pyroptose nécessite que la caspase 1 mature clive la gasdermine D. Cette dernière va alors s'oligomériser et s'insérer dans la membrane plasmique formant un pore de 10-14nm, composé de 16 protomères de gasdermine D (Broz 2015). Ce pore tue la cellule de l'intérieur via une perforation de la membrane plasmique (Guo, Callaway, et Ting 2015) ; (Broz 2015).

L'activation de l'inflammasome est régulée à plusieurs niveaux (**Voir figure 3**). Parmi les activateurs nous observons :

- **L'homéostasie ionique.** L'ATP pour Adénosine Triphosphate (en tant de DAMPs) induit une ouverture de canal P2X7, qui conduit à une fuite rapide de K<sup>+</sup> de la cellule vers le milieu extracellulaire (Tschopp et Schroder 2010). Cet efflux de K<sup>+</sup> s'accompagne d'un influx de Ca<sup>2+</sup>. Ensemble ces perturbations ioniques activent l'inflammasome (Di et al. 2018). Cette modification séquentielle du statut ionique fait intervenir deux transporteurs, le canal P2X7 (échangeur de Ca<sup>2+</sup> et Na<sup>+</sup>) puis le canal TWIK2 (efflux de K<sup>+</sup>) (Di et al. 2018). La délétion de TWIK2 dans les macrophages protège les animaux des lésions pulmonaires suite à une endotoxémie, dû à un défaut d'activation de l'inflammasome.

- **Une fuite du lysosome.** Une phagocytose inefficace (particules non dégradables (Zindel et Kubes 2020) ou rupture du phagosome (Westman et al. 2020)) peut induire une rupture des membranes des lysosomes ou phagosome, libérant le contenu dans le cytoplasme et ainsi, activant l'inflammasome. La cathepsine D initialement retrouvée dans les lysosomes participe à l'activation de NLRP3 et à la production de ROS (Guo, Callaway, et Ting 2015) ; (Broz 2015) ; (Tschopp et Schroder 2010). (Okada et al. 2014).

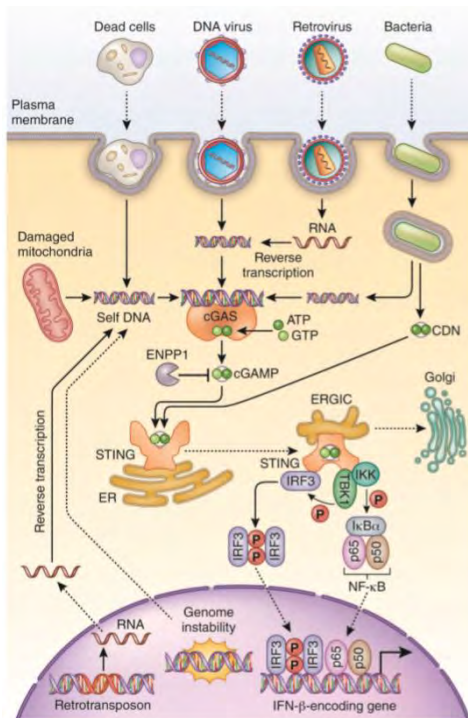
- **Des dysfonctions mitochondriales** vont libérer des ROSm (mitochondriaux) et de l'ADNm (ADN mitochondrial) qui sont reconnus comme DAMPs dans le cytosol et activent donc NLRP3 (Tschopp et Schroder 2010).



**Figure 3 : HAUT: Initiation et activation de l'inflammasome NLRP3 et Caspase 1.** Il existe deux voies d'activation. La première, dépendante de NFκB en réponse au TLR4, induit l'augmentation d'NLRP3 et d'IL-1β. La deuxième, par deubiquitination des protéines NLRP3 déjà existantes, alors que l'adaptateur ASC, doit être ubiquitinylé et phosphorylé pour que l'assemblage de l'inflammasome puisse avoir lieu. Suite à l'initiation de l'inflammasome NLRP3, une relocalisation d'NLRP3 de la mitochondrie vers le cytosol (1) doit se faire. La mitochondrie doit libérer des facteurs activateurs comme les ROSm, l'ADNm (ADN mitochondrial) ou la cardiolipine (2). La cellule doit ensuite, réaliser un efflux de potassium au travers de la membrane plasmique (3). Enfin la cathepsine doit être relarguée du lysosome suite à la déstabilisation de sa membrane (4). Récemment il a été découvert que NLRP3 se nucléarise autour d'ASC par des interactions entre les domaines PYD-PYD. La Pro-Caspase 1 bourgeonne par des interactions entre les domaines CARD-CARD, permettant une homoprotéolyse activatrice de la Pro-Caspase 1 en Caspase 1 (p10 et p20). D'après (Guo, Callaway, et Ting 2015). **Figure 3 : BAS | Les effecteurs de la Caspase 1 :** Après l'activation de la Caspase 1 par homoprotéolyse, elle se dimérise et devient active. Elle va alors initier la pyroptose par clivage de la gasdermine D ainsi que la maturation de cytokines par clivage de la pro-forme comme pour la cytokine IL1β. A partir de Bros 2015 (Basel – Suisse) (Broz 2015)

Associées aux dysfonctions mitochondriales, il existe d'autres voies d'activation de l'inflammation.

L'axe cGAS-STING reconnaît l'ADN microbien dans le cytosol (comme la preuve d'une infection intracellulaire) et provoque une activation du S.I (en activant le gène de l'IFNβ) (Qi Chen, Sun, et Chen 2016). cGAS pour Cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase détecte l'ADN et libère un messenger secondaire le cGAMP qui va activer STING. Cependant des activations aberrantes de cet axe existent, lorsque cGAS détecte de l'ADNm du soi, ceci provoque une réaction auto-immune. En effet, de par leur origine procaryote, les mitochondries conservent une structure de leur ADNm proche de celle reconnue lors d'infections (Qi Chen, Sun, et Chen 2016).



**Figure 4: La voie cGAS-STING et la détection de l'ADN cytosolique.** L'ADN libre dans le cytosol est reconnu comme PAMP (quand il est issu d'une infection microbienne) ou bien comme un DAMP (dysfonctions mitochondriales ou phagocytose de débris cellulaire). L'ADN dans le cytosol va alors se lier à cGAS qui va catalyser la synthèse de 2'3'-cGAMP à partir d'une molécule d'ATP et une autre de GTP. Ce messager secondaire (2'3'-cGAMP) va alors activer STING qui est localisé à la surface des vésicules entre le RE (réticulum endoplasmique) et le Golgi. STING va alors entraîner l'activation d'IKK et TBK1. IKK va phosphoryler IκBα et permettre au complexe protéique NFκB de rentrer dans le noyau. TBK1 lui, phosphoryle STING ce qui lui permet de recruter IRF3 (qui sera phosphorylé lui aussi par TBK1). Une fois phosphorylé IRF3 va se dimériser et entrer dans le noyau, où avec NF-κB ils induisent l'expression de l'interféron et autres cytokines inflammatoires (Qi Chen, Sun, et Chen 2016). Illustration issue de la publication de chen et collègues (Fuzhou, Chine) (Qi Chen, Sun, et Chen 2016).

Il existe d'autres mécanismes d'induction de l'inflammation. Notamment une induction de nature lipidique. En effet les macrophages, monocytes et neutrophiles synthétisent des eicosanoïdes comme les prostaglandines (PG) et leucotriènes. Il s'agit de lipides inflammatoires (Funk 2001). Ces lipides sont synthétisés par les cyclooxygénases, enzymes inhibées par les AINS (anti inflammatoire non stéroïdien) (Funk 2001). Les lipides comme les PGE2 et les PGD2 vont progressivement favoriser l'expression de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires qui va participer à la résolution de l'inflammation (Serhan, Chiang, et Dyke 2009).

### 3. Étape 3 : Résolution de l'inflammation

Après une blessure, un grand nombre de monocytes sont recrutés de la moelle osseuse vers le tissu lésé *via* des chimiokines et molécules d'adhésion. Les macrophages recrutés (issus des monocytes circulants) prolifèrent et acquièrent un phénotype proche des macrophages résidents (Scott et al. 2016; Lavin et al. 2014). Ceci enrichit le site inflammatoire en cellules immunes pour permettre l'élimination efficace du signal inflammatoire et l'arrêt de la réponse inflammatoire.

Au cours de cet arrêt, plusieurs freins se mettent en place. On retrouve parmi eux : Des médiateurs lipidiques limitant l'infiltration des neutrophiles (Soehnlein et Lindbom 2010) l'activation de la voie de l'IL-10 (interleukine 10) et du TGFβ (Transforming Growth Factor Beta) (Soehnlein et Lindbom 2010) l'efférocytose (issue du latin signifiant « porter à la tombe » ; cela définit la phagocytose des cellules apoptotiques (ACs pour apoptotic Cells) par les phagocytes) des cellules mortes (S. Zhang et al. 2019) et enfin les modifications des OXPHOS (oxydation phosphorylantes) (Nomura et al. 2016; Van den Bossche et al. 2016).

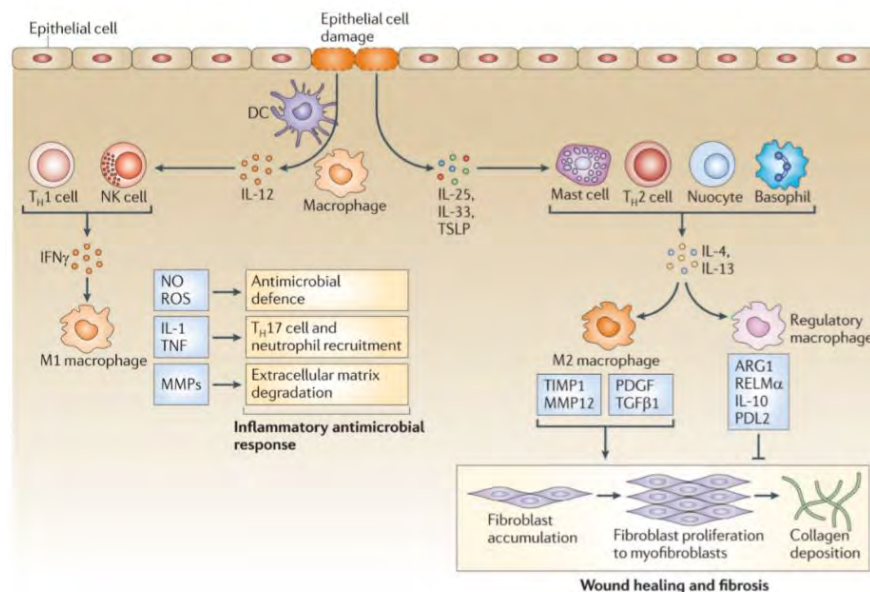
- Les médiateurs lipidiques comme les lipoxines et les résolvines, sont synthétisés par les neutrophiles et les macrophages. La lipoxine A4 inhibe l'entrée de davantage de neutrophiles sur le site inflammatoire (Soehnlein et Lindbom 2010). Les macrophages, lors de la résolution de l'inflammation, induisent l'apoptose des neutrophiles. En effet les neutrophiles ont une durée de vie limitée, ils sont alors exposés à des signaux de survie, comme IL-1 $\beta$ , le G-CSF et le GM-CSF, tous synthétisés par les monocytes et macrophages. Suite à une modification des sécrétions des macrophages (diminution d'IL-1 $\beta$ ) les neutrophiles entrent en apoptose. Ils seront phagocytés par les macrophages (Soehnlein et Lindbom 2010); (Serhan, Chiang, et Dyke 2009).

- L'Interleukine 10 est synthétisée par diverses cellules dont les lymphocytes, les mastocytes, les DCs, les monocytes et les macrophages. L'IL-10 est induite suite à un stimulus inflammatoire et a pour effet de diminuer la synthèse des cytokines inflammatoires, dont le TNF- $\alpha$  (Fiorentino et al., s. d.). Une production autocrine d'IL-10 est induite par les macrophages inflammatoires (M1) *in vitro*, ceci via une régulation de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (Baseler 2016). Il existe un rétro control positif entre la production d'IL-10 et l'activité d'efférocytose des macrophages (A-Gonzalez et al. 2010; Doran, Yurdagul, et Tabas 2020).

- Le TGF $\beta$  induit un phénotype M2 sur les macrophages, et une surexpression d'IL-10. A ce moment-là les macrophages synthétisent des métalloprotéases (MMP), du PDGF (Platelet Derived Growth Factor), et du VEGF-A (Vascular Endothelium Growth Factor A) qui favorisent le remodelage, la prolifération et l'angiogenèse du vaisseau macrophages (Soehnlein et Lindbom 2010); (Doran, Yurdagul, et Tabas 2020)

- L'efférocytose induit des modifications profondes (métabolique et sécrétoire) chez le phagocyte qui la réalise. Elle a pour effet dans les macrophages d'induire la production de cytokines anti-inflammatoires (synthèse de TGF- $\beta$ ) tout en réprimant la synthèse des cytokines inflammatoires (diminution de sécrétion de l'IL-6 et de TNF- $\alpha$ ) suite à la reconnaissance des ACs (Doran, Yurdagul, et Tabas 2020) ; (S. Zhang et al. 2019; Lantz et al. 2020)

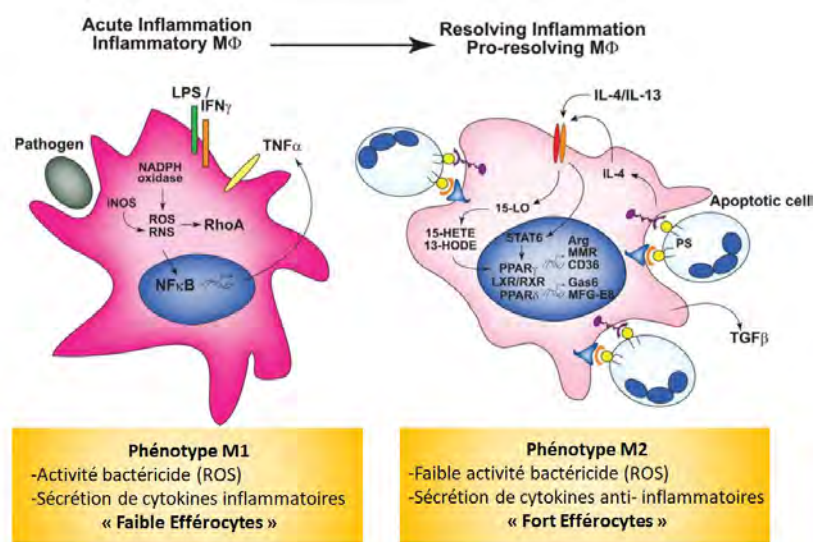
- Les OXPHOS (fonctionnelles) permettent en plus de la production d'ATP, de réaliser le switch des macrophages M1 vers des macrophages M2. L'intensité des OXPHOS est importante chez un macrophage M2 par rapport à un macrophage naïf (M0) (Van den Bossche et al. 2016; S. Zhang et al. 2019). Cette augmentation des OXPHOS s'explique par l'oxydation des acides gras par la FAO (S. C.-C. Huang et al. 2014; Nomura et al. 2016; S. Zhang et al. 2019).



**Figure 5 : Régulation de l'inflammation et la cicatrisation par différentes classes de macrophages.** Lors d'une lésion tissulaire, un recrutement massif de monocytes inflammatoires se crée. Une fois dans le tissu, ils se différencient en macrophage, puis synthétisent notamment de l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Ce dernier est libéré par les cellules inflammatoires voisines comme les neutrophiles, les « natural killer », les macrophages résidents et les lymphocytes T. Les cellules dendritiques peuvent, via les signaux dépendant des PRRs, participer au recrutement des monocytes dans le tissu. Lors de la phase d'initiation les macrophages présentent un profil M1 - inflammatoire, caractérisé par la production de NO, de ROS, l'IL-1 et de TNF $\alpha$  essentielle pour l'activité antimicrobienne. La sécrétion de métalloprotéase comme MMP2 et MMP9 par le M1 participe à la dégradation de la MEC, afin de faciliter le recrutement d'autres cellules immunes in situ. D'autres parts lors d'une lésion tissulaire, nous pouvons observer la libération d'IL-25, d'IL-33 et de Thymic Stromal LymphoPoiétin (TSLP) qui induisent l'expression d'IL-4 et d'IL-13 et leur sécrétion par les mastocytes, basophiles et TH2. Suite à l'élimination du pathogène, l'activation du M1 diminue et les alarmines types TH2 orientent la réponse immune vers un état résolutif, et pro cicatrisant où prédominent alors des macrophages dit M2. Ils favorisent la cicatrisation et la survenue de la fibrose en produisant des MMPs, des facteurs de croissances comme le platelet-derived growth factor (PDGF) et des cytokines comme le transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1). Les M2 acquièrent l'expression de l'Arginase 1 (ARG1), resistin-like molecule- $\alpha$  (RELM $\alpha$ ), programmed death ligand 2 (PDL2) et d'IL-10, tous connus pour favoriser la cicatrisation et le retour à l'homéostasie tissulaire. D'après Murray et ses collègues (Memphis -USA) (Murray et Wynn 2011).

#### 4. Étape 4 : Le retour de l'homéostasie par les macrophages

Les neutrophiles apoptotiques polarisent les macrophages vers le phénotype M2 (suite à l'efférocytose des neutrophiles) (Horckmans et al. 2016; Korn et al. 2011; S. Zhang et al. 2019) (Voir la figure 6, ci-dessous). La polarisation M2 est nécessaire pour l'élimination efficace des cellules apoptotiques par les macrophages humains (Zizzo et al. 2012).



**Figure 6: La polarisation des macrophages détermine leur capacité d'efférocytose.** A gauche, les macrophages M1 (induit par le LPS, et IFN $\gamma$ ) présentent une activité bactéricide, et une production de cytokines inflammatoires, très importante. Ils sont cependant peu équipés pour réaliser l'efférocytose. A droite, lors de la polarisation M2, les macrophages présentent davantage de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des ACs. In vivo, tout au long de la réaction inflammatoire, les programmes transcriptionnels qui définissent la polarisation des macrophages évolue, de l'état inflammatoire (M1), à celui de résolutif (M2). Illustration issue de la revue de Darlynn Korn (Denver-USA) (Korn et al. 2011)

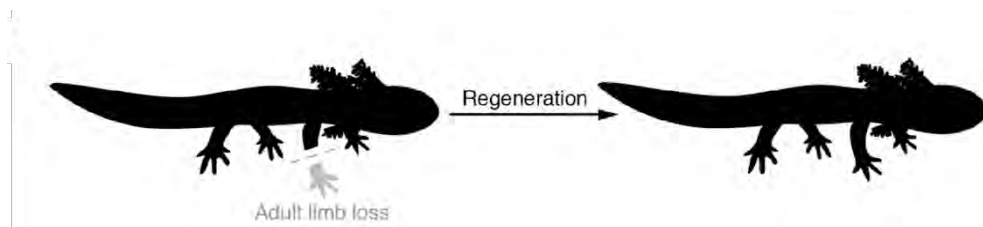
Les phagocytes se lient aux ACs par divers récepteurs comme TIM1 (T cell immunoglobulin mucin receptor 1) MerTK (Mer tyrosine kinase) et stabilin 2, ce qui entraîne la suppression de TNF- $\alpha$  et IL-6, associé à la production de TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) et de VEGF (Doran, Yurdagul, et Tabas 2020; Soehnlein et Lindbom 2010). Les phagocytes, par la sécrétion de ces facteurs de croissances, induisent l'activation des HSCs, (Hepatic stellate cells) qui jouent un rôle central dans la production de matrice extracellulaire. Cette matrice va alors devenir le théâtre de plusieurs processus biologiques, parmi eux, la fibrose, ou la régénération.

## IV. Rôle des macrophages dans la fibrose et la régénération

### 1. La régénération

La régénération est un processus naturel de remplacement et de restauration d'un élément manquant ou endommagé au niveau cellulaire, tissulaire, d'un organe ou d'un membre entier. Elle peut être incomplète et aboutir à une cicatrisation et parfois dans des conditions pathologiques conduire à la fibrose de l'organe (Seifert et al. 2012; Martin 1997).

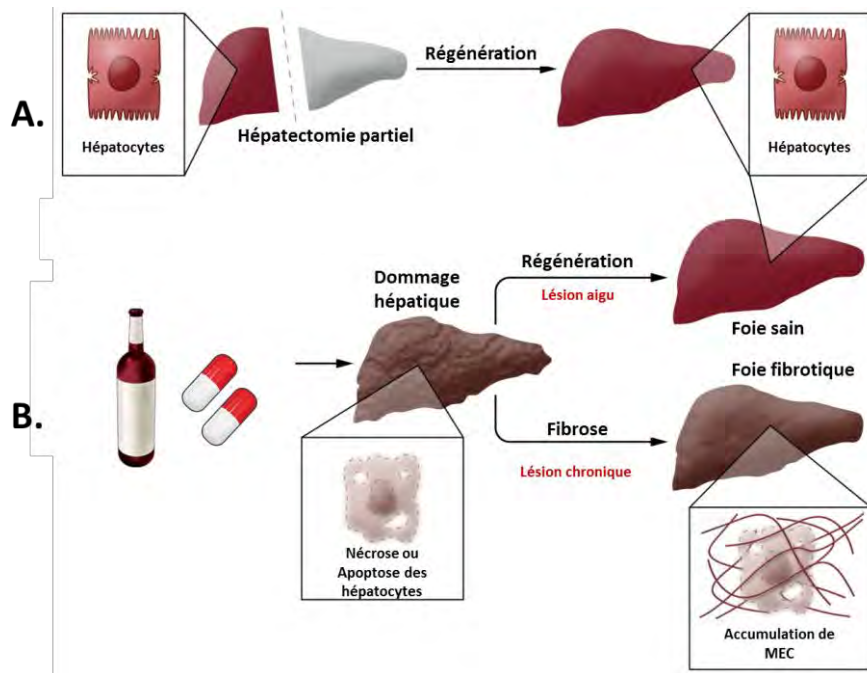
Les axolotls adultes, comme les salamandres (tous les deux des urodèles) sont capables de régénérer complètement leur derme (Seifert et al. 2012). Ce qui en fait des modèles biologiques pour étudier les processus de régénération. L'amputation d'un de leur membre entraîne un processus complexe de prolifération, différenciation, apoptose et croissance cellulaire afin de reconstruire à l'identique le membre manquant. Ceci étant orchestré en grande partie par les macrophages qui affluent massivement dans le tissu régénératif (Godwin, Pinto, et Rosenthal, s. d.). Le poisson zèbre (Zebrafish), un modèle d'étude plus répandu, possède aussi la capacité de régénérer tant le cœur que les nageoires (Poss 2002; Pfefferli et Jazwińska 2015).



**Figure 7 : exemple de régénération chez les urodèles.** Les axolotls, les salamandres et les poissons sont capables de régénérer un membre au travers d'un processus biologique qui recrée à l'original les tissus et fonctions. Ceci sans laisser de cicatrice (dépôt de matrice extracellulaire (MEC)). Adapté de Cordero - Espinoza et collègues (Cambridge, Angleterre) (Cordero-Espinoza et Huch 2018)

Chez l'Homme, il existe tout de même quelques exemples de régénération, comme celui du foie (la peau et des muscles possèdent également des fonctions de régénération mais elles ne seront pas abordées dans ce travail). Compte tenu de son positionnement anatomique et de sa fonction de détoxification, le foie est soumis à de nombreuses agressions, et a pu mettre en place des mécanismes régénératifs compensatoires visant à maintenir dans le temps sa fonction. La régénération hépatique est le plus couramment observée après une assimilation excessive de xénobiotiques comme l'acétaminophène (Paracétamol), qui provoque une nécrose centro-lobulaire.

Je présenterai cette pathologie ultérieurement au cours de l'introduction page 24. Au cours de la nécrose centrolobulaire, les hépatocytes juxtaposés à la zone nécrotique entrent en division cellulaire dans les 24 heures qui suivent la survenue de la nécrose. Ces hépatocytes libèrent des signaux mitogènes comme du FGF1/2, le VEGF et du GM-CSF, un signal mitogène pour les Kupffer cells (KC) (les macrophages résidents du foie). Cela permet, *in fine*, de régénérer des lobes hépatiques fonctionnels (Michalopoulos 2020). La régénération et la fibrose sont des processus partageant des similitudes (**Voir Figure 8 ci-dessous**). Elles surviennent suite à une lésion et leur réalisation est dépendante des macrophages et de leur statut.



**Figure 8 : Balance entre la régénération et la fibrose.** (A) Le foie est l'un des rares organes chez le mammifère adulte à conserver une capacité de régénération. Une résection jusqu'à 70% de la masse du foie via une hépatectomie partielle, entraîne une croissance compensatoire des tissus intacts afin de restaurer l'entièreté de la masse et de la taille de l'organe. Cependant un foie réséqué n'est pas un foie altéré ou lésé. Sa régénération est dépendante de son habileté à détecter une insuffisance de taille et de masse vis-à-vis du poids du corps. (B) Le foie peut aussi se régénérer suivant une lésion (alcool, xénobiotiques) qui aboutit à la mort d'hépatocytes. Ce processus est caractérisé par une réaction inflammatoire, une synthèse et le remodelage d'une matrice extracellulaire (MEC) permettant la régénération. Cependant, si la lésion hépatique persiste, le tissu sera cicatrisé plutôt que régénéré, et gardera des cicatrices aussi connues sous le nom de fibrose, ce qui altère la structure tissulaire ainsi que la fonction de l'organe. Adapté de Cordero - Espinoza et collègues (Cambridge, Angleterre) (Cordero-Espinoza et Huch 2018)

## 2. La fibrose

La fibrose, notamment celle du foie, est dépendante des macrophages (Kolios 2006). La fibrose hépatique est une accumulation de matrice extracellulaire qui survient dans plusieurs pathologies chroniques du foie comme la cirrhose ou le NASH (Kolios 2006).

Dans les années 1970, il a été démontré que la fibrose hépatique pouvait être partiellement réversible, sans pour autant identifier le fonctionnement sous-jacent et les cellules impliquées.

Un premier élément de réponse est identifié en 1980 lors de la découverte du rôle des HSCs (hepatic stellate cells) dans la synthèse du collagène au cours de la fibrose hépatique. Ces cellules, décrites à l'origine par Von Kupffer en 1876 s'activent suite à diverses sécrétions et deviennent des myofibroblastes (Bataller et Brenner 2005); (Cordero-Espinoza et Huch 2018). L'équipe de Robert F. Schwabe a montré grâce à un modèle de souris transgéniques qui permet de suivre les HSCs, qu'elles contribuent à l'émergence de 80-90% des myofibroblastes dans le foie lors de stress chroniques (Mederacke et al. 2013). Une fois activés, les myofibroblastes sont maintenus en vie par les KC. Il est décrit une voie dépendante NF- $\kappa$ B favorisant la survie des myofibroblastes activés par les macrophages du foie (dû à la libération d'IL-1 et de TNF) et non pas par les DCs (Pradere et al. 2013).

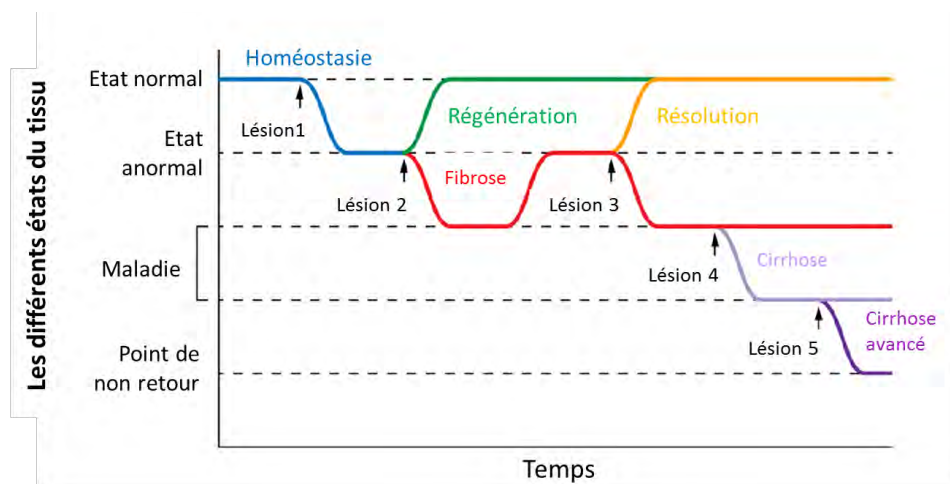
Le deuxième élément de réponse réside dans le rôle des macrophages. Il a été démontré que les macrophages participent aussi à la résorption de la fibrose (P. Ramachandran et Iredale 2012). En effet, la déplétion des macrophages au cours de la résorption de la fibrose (induite par le traitement chronique au CCL4) entraîne un défaut de résorption de la fibrose (P. Ramachandran et Iredale 2012). Lors de la résorption, les macrophages produisent plusieurs MMPs (métalloprotéases) notamment la MMP-13, qui est essentielle pour la dégradation du collagène (chez le rongeur) (P. Ramachandran et Iredale 2012). Les macrophages produisent également des molécules pro-apoptotiques pour les myofibroblastes (comme TRAIL et MMP-9).



Mais, alors comment une même cellule peut-elle générer des effets biologiques aussi variés ?

La question n'est pas complètement élucidée. Toutefois, un début de réponse semble apparaître dans la diversité et la cinétique des réponses du foie lors d'agression(s). (**Voir figure 9**).

A l'état physiologique, la matrice extracellulaire du foie est composée de collagène de type IV, de laminine, et de protéoglycane, qui sont progressivement remplacés lors de la fibrose par du collagène I et III sécrétés par les HSCs (Kolios 2006). *In vivo*, les KC sont impliqués dans l'activation des HSCs par la synthèse de TGF- $\beta$ 1 et PDGF (Kolios 2006).



**Figure 9 : Altération de la capacité du tissu à retourner à l'homéostasie par la fréquence des lésions.** Chez un individu sain, une lésion ponctuelle du foie (Lésion 1) entraînera une réponse régénérative (courbe verte) qui permet un retour à la physiologie du tissu. Des lésions répétées (Lésion 2 et 3) empêchent cette régénération et conduisent le foie dans un état fibrosé (courbe rouge Lésion 1+2). Le foie peut encore une fois revenir à l'état physiologique à condition qu'il n'y ait plus de dommage hépatique (résolution de la fibrose) (Lésion 1+2 et le temps, courbes jaunes). Si un nouveau dommage survient, la fibrose demeurera (courbe rouge : Lésion 1+2+3). De plus, les lésions détériorent le tissu ce qui fait le lit de la cirrhose (Lésion 1+2+3+4, courbe mauve claire) ou d'une cirrhose avancée (Lésion 1+2+3+4+5, courbe mauve). Adapté de Cordero - Espinoza et collègues (Cambridge, Angleterre) (Cordero-Espinoza et Huch 2018)

Les macrophages possèdent un très large spectre de phénotypes. Ils peuvent rapidement acquérir un aspect inflammatoire, ou à l'inverse plutôt anti-inflammatoire. Cette plasticité est induite de diverses façons notamment lors de l'efférocytose. Les ACs présentent des signaux dits « eat me » parmi lesquels la phosphatidylsérine (PS) externalisée sur le feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique (Lemke 2019). Un des récepteurs impliqués dans l'efférocytose est le récepteur Mer tyrosine kinase (MerTK). La délétion de ce récepteur à la surface des macrophages aboutit à un défaut d'efférocytose *in vitro* et *in vivo*, ceci dans un contexte pathologique d'athérosclérose (Thorp s. d.).

Au cours du NASH (Nonalcoholic steatohepatitis) les KC, après efférocytose (induite par la reconnaissance de l'ACs via MerTK) se mettent à synthétiser et libérer du TGF- $\beta$ 1 ce qui active les HSC (Cai et al. 2020). Dans le même temps l'efférocytose entraîne aussi l'activation de mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin complex 1), ce qui active la lipolyse dépendante du lysosome et oriente le macrophage dans un phénotype M2 (W. Liu et al. 2019). A l'inverse, la perte de l'activité de mTORC1 participe à la progression du NASH. Ceci est dû à un dysfonctionnement du lysosome, qui diminue donc l'activité protéolytique du macrophage, ainsi que la réponse M2 (W. Liu et al. 2019). Dans ce cas précis, un défaut d'efférocytose (médié par la perte d'activité de mTORC1) est délétère pour la survie au cours du NASH (W. Liu et al. 2019).

A l'inverse, dans une publication de 2020, Zhou et ses collègues ont démontré en cancérologie que limiter l'efférocytose par l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre MerTK était bénéfique pour la survie. Une inhibition de l'efférocytose entraîne une réaction inflammatoire due à l'accumulation des ACs, dans les tumeurs. Ce qui favorise une réponse immunitaire type Th1 et permet l'élimination de la tumeur et la survie des animaux (Y. Zhou et al. 2020). Dans ce cas précis, un défaut d'efférocytose est propice à la survie, ceci par l'induction d'une inflammation. Cette dernière est le plus souvent réprimée par le microenvironnement tumoral afin de promouvoir la croissance et dissémination métastatique sans alerter le système immunitaire.

L'efférocytose est médiée par l'expression de MerTK ainsi que de la plasticité du macrophage à devenir M2. Toutes deux sont variables chez les macrophages :

- Tous les macrophages n'expriment pas MerTK de la même façon. Son expression est induite en présence des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) (Zizzo et al. 2012; Doran, Yurdagul, et Tabas 2020). Shuang Zhang et ses collègues ont publié que les macrophages réalisant l'efférocytose ont une OXPHOS augmentée, et résultant de l'oxydation des AG ou FAO (Fatty Acid Oxidation, pour Beta oxydation). Ces modifications métaboliques permettent la synthèse de l'IL-10, propice à la régénération cardiaque après un infarctus (S. Zhang et al. 2019). Cependant, dans cet article les auteurs ne précisent pas la part d'efférocytose dépendante de MerTK. D'autres publications confirment que l'efférocytose permet la synthèse d'IL-10 et TGFβ1 via une cascade impliquant les stéroïdes issus du phagolysosome qui viennent alors activer PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ) et LXRα (liver X receptor-α) (Doran, Yurdagul, et Tabas 2020).
- Une étude récente de single cell RNA-Seq sur des macrophages péritonéaux révèle pour la première fois l'hétérogénéité de la capacité de reprogrammation une fois l'efférocytose réalisée (Lantz et al. 2020). Cette hétérogénéité était jusqu'à présent masquée par les études en bulk – RNA Seq. De plus, cette approche prend soin de limiter la prise en compte d'un autre biais ; celui des ARNm issus des ACs présents dans les phagocytes qui ont réalisés l'efférocytose. Ces ARNm appelés « ARNm passagers » pourraient faire varier le transcriptome du phagocytes (Lantz et al. 2020).

Un défaut en efférocytose entraîne de sévères conséquences sur l'homéostasie et l'inflammation (Lemke 2019; W. Liu et al. 2019). Cette inflammation peut néanmoins “sortir des clous” de la réaction dite “aiguë et contrôlée” pour devenir excessive et/ou chronique.

## V. Les effets négatifs de l'inflammation

L'inflammation aiguë s'oppose à l'inflammation chronique (Hotamisligil 2006). L'inflammation chronique est l'une des maladies les plus courantes et entraîne de lourdes pertes humaines chaque année dans le monde (Furman et al. 2019). L'inflammation chronique est considérée comme la cause de la mort de plus de 50% des décès attribués aux maladies auto-immunes, aux maladies cardiaques, aux cancers, au diabète ainsi qu'à l'obésité (Furman et al. 2019). L'inflammation aiguë, suite à une dérégulation ou un emballement peut entraîner une réponse immunitaire létale, notamment via le déclenchement d'une tempête cytokinique (D. Yang, Han, et Oppenheim 2017; Nedeva, Menassa, et Puthalakath 2019) (**Voir figure 10**)

### 1. L'origine de l'inflammation médiée par les DAMPs et les LAMPs

Le système immunitaire inné initie la première réponse de l'organisme après reconnaissance du motif pathogène au travers des PAMPs qui peuvent aussi entraîner la libération de DAMPs (D. Yang, Han, et Oppenheim 2017).

Un nouveau concept émerge, celui des LAMPs (Lifestyle-associated molecular patterns). Il s'agit de molécules inflammatoires dont l'abondance dans le corps est corrélée au style de vie et dont l'élimination par le système immunitaire est impossible, entraînant un défaut de résolution de l'inflammation. Celle-ci fait le lit d'une inflammation chronique avec des morbidités associées (Zindel et Kubes 2020). Parmi les LAMPs endogènes, nous retrouvons les cristaux de cholestérol, d'acide urique mais aussi des résidus oxydés de lipoprotéines ou encore de la protéine bêta-amyloïde (Maladie de Creutzfeldt-Jakob). Il existe des LAMPs exogènes comme l'amiante ou des matériaux prothétiques qui sont directement liés à l'environnement (Zindel et Kubes 2020). Les LAMPs perturbent les phases tardives de la réponse inflammatoire alors que les DAMPs sont des éléments initiaux dans l'inflammation.

#### 1.1. L'inflammation stérile : le cas de l'insuffisance hépatique

Un cas d'inflammation stérile répandu chez l'Homme, est l'insuffisance hépatique aiguë ou ALF (acute liver failure) d'origine médicamenteuse. Une étude faite aux Etats-Unis en 2004 sur 662 patients avec une ALF a démontré que 275 des ALFs sont dues à une surdose (« overdose » en anglais) d'Acétaminophène (APAP) (Larson et al. 2005). Cette étude a montré que 73% des patients survivent alors que 27% d'entre eux succombent de l'ALF (Larson et al. 2005). L'APAP est consommé de façon hebdomadaire par 60 millions d'américains, il est donc l'analgésique et l'antipyrétique le plus couramment utilisé aux Etats-Unis (Herndon et Dankenbring 2014). Les DILI (Drug Induced Liver Injury) surviennent avec des doses de 150 mg/kg d'APAP (11 grammes pour un homme de 75 kg), mais certaines insuffisances hépatiques surviennent avec des doses plus faibles (Eric Yoon 2016). (**Voir figure 9**).

Cette maladie peut être décrite dans le temps, de la façon suivante :

**PHASE I** : Elle concerne les 24 premières heures. Au début, les symptômes sont : de la nausée, des vomissements, des malaises, une léthargie et diaphorèse (hypersudation) alors que les AST (Aspartate transaminase) et ALT (Alanine aminotransférase) sont encore à des valeurs physiologiques à une concentration de 10 – 30 UI/L dans le sang. Elles augmenteront entre 8 à 12 heures après l'overdose (Eric Yoon 2016).

**PHASE II** : Elle survient entre les 24 et 72 heures. C'est une période de latence avec une amélioration des symptômes. Cependant, les ALT et AST augmentent. Les cas sévères présentent une hépatomégalie

et une douleur dans le quadrant droit supérieur, une jaunisse et une coagulopathie, quelques fois (2%) associée à des dysfonctions rénales (Eric Yoon 2016).

**PHASE III** : Elle survient entre 72 et 96 heures. Elle présente un retour des symptômes de la phase I avec des ALT et AST très élevés (possiblement supérieur à 3000 IU/L) associées à une jaunisse, une encéphalopathie et une acidose lactique. Les plus grands dommages hépatiques surviennent à ce moment-là. L'acidose lactique est de mauvais pronostic, et s'explique par une incapacité du foie à réaliser la clairance de l'acide lactique (Eric Yoon 2016).

**PHASE IV** : Après les 96 heures jusqu'à deux semaines. Elle présente une résolution progressive des symptômes de la phase III (Eric Yoon 2016).

De façon plus détaillée, l'overdose d'APAP génère une nécrose centro-lobulaire et a pour cible cellulaire l'hépatocyte (Lf 1980; Si et al. 2017; McGill et Jaeschke 2013) ; (Eric Yoon 2016). Voici de façon schématique les étapes clés du catabolisme de l'APAP :

#### Le métabolisme de l'APAP dans l'hépatocyte et synthèse de NAPQI

La fraction de l'APAP délétère est celle catabolisée par le cytochrome P450 (CYP2E1) en un métabolite toxique le NAPQI (N-Acetyl-P-benzoQuinone Imine) (Larson et al. 2005); (Eric Yoon 2016). La formation du NAPQI ne survient que dans une faible fraction du catabolisme de l'APAP. La plus grande partie de l'APAP (90%) est éliminée par glucuronidation et sulfatation. Ces réactions sont réalisées par les enzymes UDP-glucuronosyltransférases (UGT1A1 et 1A6) et sulfotransférases (SULT1A1, 1A3/4, et 1E1) respectivement, ceci sans entraîner de dommage tissulaire, car le produit de ces réactions n'est pas toxique. Une autre très faible partie de l'APAP est excrétée par les urines (2%). Le NAPQI provient de 5-9% du catabolisme de l'APAP (Eric Yoon 2016) (**Voir figure 9**).

#### Les cibles du NAPQI

Le NAPQI entraîne une oxydation du NADH mitochondrial, une fuite du calcium mitochondrial (Weis et al. 1992), des adduits protéiques et qui, conjointement, inhibent la respiration mitochondriale et diminuent la synthèse d'ATP (Eric Yoon 2016). Ces dysfonctions mitochondriales entraînent un stress oxydant qui est la cause majeure des DILI (Eric Yoon 2016). Le NAPQI se lie de façon covalente au groupement soufré des cystéines et lysines des molécules de la mitochondrie d'une part et à la GSH (Glutathion) d'autre part (McGill et Jaeschke 2013; Eric Yoon 2016; Larson et al. 2005; Si et al. 2017). La GSH et les enzymes qui régulent sa disponibilité sont essentielles au maintien des défenses antioxydantes notamment contre le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sies et al. 1997).

## Mode d'action du NAPQI et la survenue du DILI

1ère axe : Le rôle des hépatocytes : Le NAPQI, via son action sur la mitochondrie, entraîne une ouverture transitoire des pores mitochondriaux (MPT) conduisant à un gonflement mitochondrial, une rupture de la membrane externe et la libération de médiateurs apoptotiques, ce qui annihile le potentiel de membrane et la synthèse d'ATP mitochondriale. Ceci aboutit à la fragmentation de l'ADN nucléaire et la nécrose de l'hépatocyte. L'apoptose peut aussi être induite par la libération du cytochrome qui active les caspases (Jaeschke, McGill, et Ramachandran 2012; Yuan et Kaplowitz 2013). L'important stress oxydant provenant des mitochondries hépatocytaires est aboli complètement en utilisant l'antioxydant NAC (*N*-acétylcystéine) et son utilisation protège de la toxicité de l'APAP (Reid et al. 2005). De plus, les animaux hétérozygotes pour la SOD2 sont plus susceptibles de développer des lésions mitochondriales. Les animaux SOD +/- présentent une activation prolongée de la voie JNK lors de l'APAP augmentant davantage le stress oxydant et entraînant davantage de dysfonctions mitochondriales (A. Ramachandran et al. 2011; Jaeschke et al. 2012).

2ème axe : Le rôle des KC (Kupffer Cells): les KC libèrent de nombreuses cytokines comme l'IL-1 ( $\alpha$  et  $\beta$ ), l'IL-6, le TNF- $\alpha$  (James, Mayeux, et Hinson 2003) et des ROS (Dixon et al. 2013) lors d'une DILI à l'APAP. Cependant, les ROS produits par les KC ne sont pas prépondérants dans le stress oxydant lors d'une DILI à l'APAP. En effet, une étude sur des souris avec la NADPH oxydase (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) dysfonctionnelle (KO pour le gène CYBB qui code pour la sous unité essentielle ; gp91-phox) ne présentent ni une diminution de la quantité de ROS, ni une diminution des lésions hépatiques suite à l'overdose d'APAP (James, Mayeux, et Hinson 2003; C. D. Williams et al. 2014; Jaeschke et al. 2012). Ce qui montre bien que le dommage tissulaire du DILI à l'APAP n'est pas dû aux ROS produits par les KC. De plus, les hépatocytes n'expriment pas la NADPH oxydase. Ceci consolide l'hypothèse selon laquelle les mitochondries des hépatocytes sont la source majeure de ROS alors que celles des KC, en émettent que de façon minoritaire.

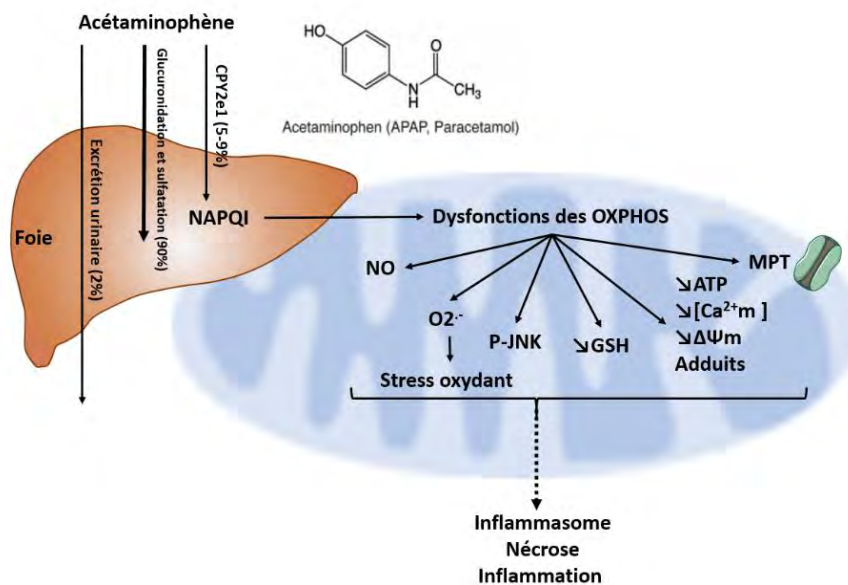
Le rôle délétère du TNF- $\alpha$  libéré par les KC lors d'une overdose d'APAP est controversé. En effet, les animaux KO pour le TNF- $\alpha$  ne sont pas protégés face à l'overdose d'APAP (Boess et al. 1998). Il semble même que le TNF- $\alpha$  lors d'une overdose d'APAP favorise la régénération hépatique. Les souris dépourvues du récepteur au TNF- $\alpha$  (TNFR1-/-) présentent un retard de régénération après l'APAP (Chiu 2003; Dixon et al. 2013).

Lors d'un DILI à l'APAP les hépatocytes et les KC libèrent une grande quantité de MCP1. Les animaux CCR2-/- (le récepteur d'MCP1) ne sont pas non plus protégés contre les dommages induits par l'APAP. Ceci prouve que lésions tissulaires dû à l'APAP ne sont pas dues au recrutement de l'immunité. Cependant les animaux CCR2-/- présentent un retard dans l'élimination des zones nécrotiques induites par l'APAP par rapport aux WT (Holt, Cheng, et Ju 2008). Ce retard peut s'expliquer par l'absence du recrutement *in situ* pour réaliser l'efférocytose des hépatocytes nécrotiques, ce qui retarde leur élimination et prolonge l'inflammation (Holt, Cheng, et Ju 2008). Ces résultats vont dans le même sens que ceux publiés par Triantafyllou en 2018. En effet, ils ont montré que les animaux ayant une déficience totale pour le gène MerTK (Mertk<sup>mi6a</sup>) présentent, au cours d'un DILI à l'APAP, un retard de régénération hépatique et une diminution des macrophages de type M2 (Triantafyllou et al. 2018).

Cependant, il n'y a pas d'évidence directe de la contribution du stress oxydant des neutrophiles dans l'évolution de la toxicité médiée par l'APAP (Cover et al. 2006). L'activation des neutrophiles au cours de l'APAP médiée par l'IL-1 $\beta$  n'augmente pas le dommage tissulaire (C. D. Williams, Farhood, et Jaeschke 2010) alors qu'il semble que l'activation par l'IL-1 $\alpha$  soit impliquée dans la pathogénicité du DILI à l'APAP (C. Zhang et al. 2018). Les **monocytes** infiltrés présentent un phénotype pro-résolutif avec d'une part l'expression de médiateurs angiogéniques et d'autre part en activant la clairance des **neutrophiles** (Zigmond et al. 2014) ; (Holt, Cheng, et Ju 2008).

Pour consolider l'hypothèse selon laquelle les KC limitent l'intensité des dommages suite à une DILI à l'APAP, il a été montré que l'élimination complète des KC par l'utilisation de clodronate aggrave considérablement la lésion hépatique suite à une DILI à l'APAP (Ju et al. 2002; Jaeschke et al. 2012; Holt, Cheng, et Ju 2008). Cette aggravation serait due à l'absence d'IL-10 et d'un défaut de switch de phénotype vers le M2 dépendant de l'efférocytose (Bourdi 2002; Ju et al. 2002; Dixon et al. 2013; Triantafyllou et al. 2018). Ensemble, ces éléments mettent en évidence que le rôle des KC favorisent l'expression génique et le recrutement de populations immunes, impliquées dans la régénération (Jaeschke et al. 2012).

Un DILI à l'APAP entraîne une libération importante et incontrôlée de cytokines inflammatoires, aussi bien connue sous le nom de **tempête cytokinique**. Cette tempête cytokinique est retrouvée avec diverses maladies stériles ou infectieuses. Ce terme a été largement popularisé en 2005 (avec le virus H5N1) et en 2020 (avec la COVID-19) (P. Mehta et al. 2020; Tisoncik et al. 2012). Mais de façon moins médiatisée et ponctuelle, la tempête cytokinique est aussi retrouvée lors des infections mortelles, appelées sepsis ou choc septique (Chousterman, Swirski, et Weber 2017). (**Voir figure 10**).



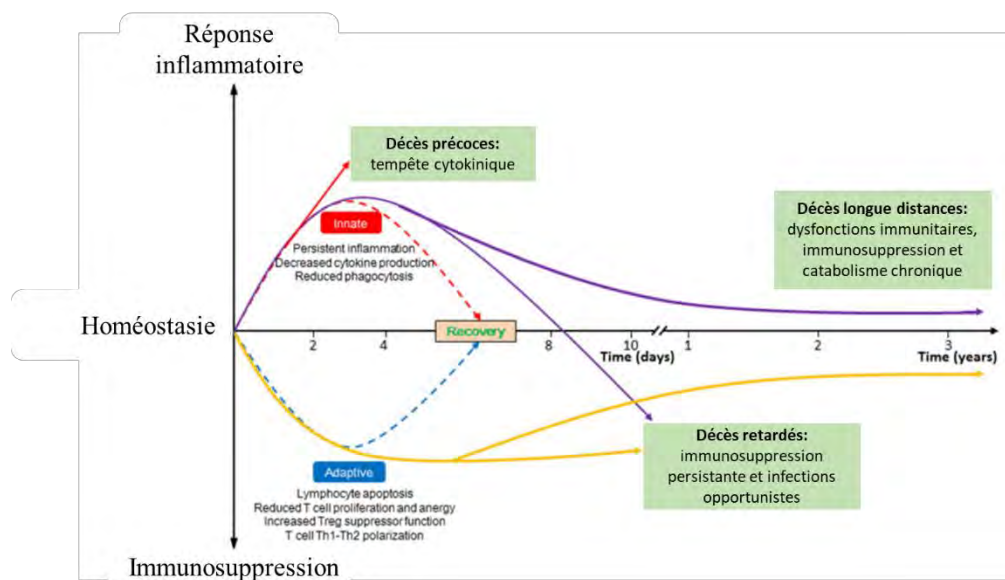
**Figure 10 : Effet délétère d'une overdose d'APAP sur la mitochondrie des hépatocytes.** L'APAP est majoritairement (90%) dégradé par glucuronidation et sulfatation par les hépatocytes. Un très faible pourcentage (2%) est excrété dans les urines. Enfin un faible pourcentage est converti en NAPQI par les CYP2e1. Ce dernier entraîne des dysfonctions globales du chondriome en réalisant des adduits protéiques, la synthèse de ROSm et de NO, la diminution de la synthèse d'ATPm, la fuite de calcium et l'ouverture des pores mitochondriaux (MPT). L'ensemble de ces éléments vont converger vers une toxicité cellulaire qui va déboucher sur une libération d'IL-1 $\beta$ , de l'activation de la caspase 1 et d'une nécrose stérile. c-Jun N-terminal kinase (JNK) participe à la mort des hépatocytes. p-c-Jun va transloquer dans la mitochondrie perturbant davantage la CTE (chaîne de transport des électrons) et accentuant la génération des ROSm. Représentation issue des publications suivantes : Yuan et collègues (Californie-USA) (Yuan et Kaplowitz 2013); James et collègues (Arkansas – USA) (James, Mayeux, et Hinson 2003) ; Eric et collègues (New Jersey-USA) (Eric Yoon 2016).

## VI. L'inflammation infectieuse et septicémie

### 1. Le choc septique

Le terme « sepsis » issue du grec signifie « putréfaction ». Le sepsis est une maladie inflammatoire provoquée par la réponse immunitaire de l'hôte qui reconnaît les PAMPS puis des DAMPS (Nedeva, Menassa, et Puthalakath 2019). Le sepsis est une des principales causes de mortalité à travers le monde. Il est estimé que 30 – 31,5 millions de personnes en souffrent chaque année et que 5,3 – 8 millions de personnes en meurent chaque année (Reinhart et al. 2013; Fleischmann et al. 2016; Shankar-Hari et al. 2016). A ce nombre, doit s'ajouter, 1 million de mort-nés et 100 000 femmes qui décèdent chaque année dû aux sepsis maternels ou du nouveau-né (Vogel 2017).

Les représentations divergent pour illustrer de façon simple la cinétique des réactions antagonistes qui surviennent lors d'un sepsis. Richard Hotchkiss a plusieurs fois publié et retravaillé les représentations des réactions d'un sepsis (Hotchkiss, Monneret, et Payen 2013; Hotchkiss et al. 2009). En 2019 une autre équipe, celle du Dr Yanfen Chai a publié une autre représentation d'un sepsis dont l'image ci-dessous est extraite (Cao, Yu, et Chai 2019).



**Figure 11 : Cinétique de la réponse immune lors d'un sepsis** : Rapidement une activation innée et adaptative survient lors du sepsis. Deux réponses, pro- et anti-inflammatoires sont impliquées lors d'un sepsis. Les morts précoces durant l'inflammation sont dues à la tempête cytokinique associée à des défaillances multi organes (au sommet de la courbe rouge). Les décès de la deuxième phase sont dus à l'immunosuppression et la survenue de maladies infectieuses opportunistes (le bas de la courbe jaune). La troisième cause de décès, les décès longue distance, sont dû à une immunosuppression persistante et des dysfonctionnements immunitaires (surviennent après plusieurs années). Illustration issue de Cao et collègues (Tianjin-Chine) (Cao, Yu, et Chai 2019).

## Les causes

Il y a autant de sepsis dû aux bactéries gram-négatives (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) qu'aux bactéries gram-positives (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*) (Vincent et Abraham 2006; Hübner, Layland, et Hoerauf 2013; Nedeva, Menassa, et Puthalakath 2019). Cependant le sepsis n'a pas toujours pour origine une bactérie, et des parasites, des champignons ou un virus peuvent aussi être des éléments déclencheurs d'un choc septique (Hübner, Layland, et Hoerauf 2013; Florescu et Kalil 2014; Liang 2016).

## Les symptômes inflammatoires : la tempête cytokinique

Les patients qui souffrent d'un sepsis peuvent développer des symptômes précoces comme le DIC (disseminated intravascular coagulation) dû à une activation aberrante des plaquettes (Y. Wang et al. 2018). Puis ils développent un sHLH (Hemophagocytic lymphohistocytosis ou « Lymphohistiocytose hémophagocytaire ») associé à des MODS (Multi-Organ Dysfunction Syndrome) (Nedeva, Menassa, et Puthalakath 2019; P. Mehta et al. 2020). Le MODS peut s'expliquer en partie par la survenue d'une vasodilatation périphérique qui entraîne une baisse de pression et une hypoperfusion. Chez l'Homme, les HLH sont caractérisées par la tempête cytokinique et les MODS (Karakike et Giamarellos-Bourboulis 2019). Cette première vague inflammatoire s'accompagne d'une apoptose massive des cellules immunitaires (Cao, Yu, et Chai 2019).

## Les symptômes de l'immunosuppression

A ce moment-là, les patients sont affaiblis et présentent huit fois plus de risques de développer des infections dues à l'immunosuppression (Cao, Yu, et Chai 2019). Chez l'Homme, cette immunosuppression ou leucopénie est due à une apoptose des lymphocytes B, des Lymphocytes T CD4+ et CD8+, des DCs et des NKs dans les organes lymphoïdes comme le thymus, la rate et les nœuds lymphatiques (Hotchkiss et al. 2005). Les neutrophiles circulants, eux, présentent un phénotype immature qui affecte leur diapédèse et leur capacité à réaliser leur fonction immunologique (Demaret et al. 2015). Des études d'autopsie de patients décédés de sepsis révèlent que l'apoptose des leucocytes est corrélée à la survenue de la mort (Torgersen et al. 2009).

Chez la souris, lors de l'induction d'un sepsis (entre 36 heures et 48 heures après la perforation de la paroi du tube digestif) les auteurs constatent une apoptose massive des DCs et macrophages induits par l'activation de la caspase 3. Cette apoptose massive coïncide avec l'arrivée de la forte probabilité de mortalité chez les animaux ayant subi la CLP (Cecum Ligature Punction) (Tinsley et al. 2003; Hotchkiss, Monneret, et Payen 2013). La CLP est un modèle de sepsis induit par la perforation de la paroi du Cecum. Ce qui provoque un épanchement du contenu luminal du tube digestif dans le péritoine et initie la tempête cytokinique et l'immunosuppression qui affaiblissent gravement l'organisme contre les agents microbiens (Peck-Palmer et al. 2009).

Il est intéressant de comparer les différences de réponses inter-espèces. Une injection d'IL-6 (2 ng/kg) en intraveineuse à des patients humains et une injection d'IL-6 (500 ng/kg) en intrapéritonéal à une souris entraînent de façon similaire, Quatre heures après l'injection, une lymphopénie. Cependant il faut une dose 250 fois plus forte en IL-6 à la souris pour entraîner cette lymphopénie, par rapport à la dose injectée à l'Homme. De plus, l'Homme présente une fièvre, une tachycardie et une légère hypotension, qui ne se sont jamais observées chez la souris (Copeland et al. 2005). Ceci souligne la diversité des réponses inter-espèces face lors de l'inflammation. Les conclusions établies chez la souris (*mus musculus*), doivent être extrapolées avec précaution à l'Homme.



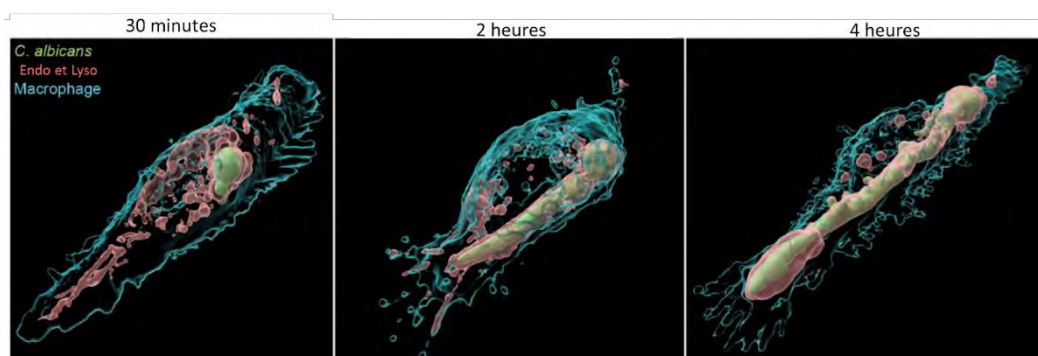
## Le cas d'un sepsis par la levure *Candida Albicans*

*C. Albicans*, est une levure commensale. Elle est retrouvée chez l'Homme au niveau de ses muqueuses et tube digestif, ceci sans provoquer de dommage. Cependant, il arrive qu'il puisse atteindre la circulation sanguine (immunodépression, perforation intestinale, accouchement) dans ces cas, elle est très nocive. Chez l'Homme, il peut induire des sepsis lorsqu'il est retrouvé dans la circulation sanguine. Les macrophages de la rate, ou ceux du foie sont identifiés comme participant à son élimination et prémunissent de sa dissémination (Austermeier et al. 2020). *C. albicans* est reconnu majoritairement par le récepteur au complément 3 (CR3) et permet aux phagocytes de l'éliminer au cours du sepsis (Duggan et al. 2015).

En premier, le pathogène est reconnu par les récepteurs de la phagocytose (Dectine et CR3). En deuxième, il y a formation du phagosome par prolongement des pseudopodes. Plusieurs protéines interviennent à ce moment, comme FAK, rac1, CDC42, et Elmo1 afin de réorganiser le cytosquelette cellulaire (Miao et al. 2020). La formation du phagosome nécessite la phosphorylation et l'activation de Src par FAK qui entraîne in-fine l'activation par phosphorylation de Rac-1, ERK, et la polymérisation d'actine et le réarrangement du cytosquelette (Banerjee et al. 2011).

La maturation du phagosome consiste en l'acquisition des propriétés microbicides. Ce dernier fusionne alors avec des endosomes et des lysosomes, qui apportent à sa membrane la NADPH oxydase et l'ATPase vacuolaire (v-ATPase) permettant l'acidification de la lumière du phagosome (pH 4,7-5,5) et la génération de ROS (Austermeier et al. 2020). Une fois à l'intérieur du phagosome, et durant sa maturation *C. albicans* riposte et réalise une transition levure-hyphes. Lorsqu'il « transitionne », *C. albicans* s'allonge pour générer l'hyphes, qui permet sa réplication mais aussi la rupture de la membrane, une fuite de H<sup>+</sup> et par conséquent une alcalinisation du phagosome et sa libération ce qui induit la virulence du pathogène (Austermeier et al. 2020) ; (Duggan et al. 2015). (Westman et al. 2020). **(Voir figure 11)**

En contre-attaque, le phagosome du macrophage, sous la contrainte de l'étirement de sa membrane, libère du calcium qui permet le recrutement et la fusion des lysosomes présents dans la cellule, ceci afin d'augmenter la surface de sa membrane (Westman et al. 2020). D'autres pathogènes, ont développé des stratégies voisines/similaires pour s'échapper du phagolysosome. Soit avec des systèmes de reflux des H<sup>+</sup> comme *Mycobacterium Tuberculosis* et *Histoplasma capsulatum*, soit en augmentant le diamètre du phagolysosome, afin de retarder son acidification et augmenter la tension sur sa membrane pour la faire céder comme le fait *Cryptococcus neoformans* (Dragotakes et al. 2020).



**Figure 12 : Transition levure-hyphes et extension de la membrane du phagosome.** Reconstruction d'images en microscopie confocale pour illustrer l'extension de *C. albicans* (en vert) et donc celle de son phagosome (en rouge). Afin de prévenir de la rupture de sa membrane, le phagosome fusionne avec les endosomes et lysosomes (en rouge) présent dans le macrophage (RAW264.7 en bleu), et ainsi augmenter sa surface. Issue de Westman et de collègues (Toronto-Canada) (Westman et al. 2020).

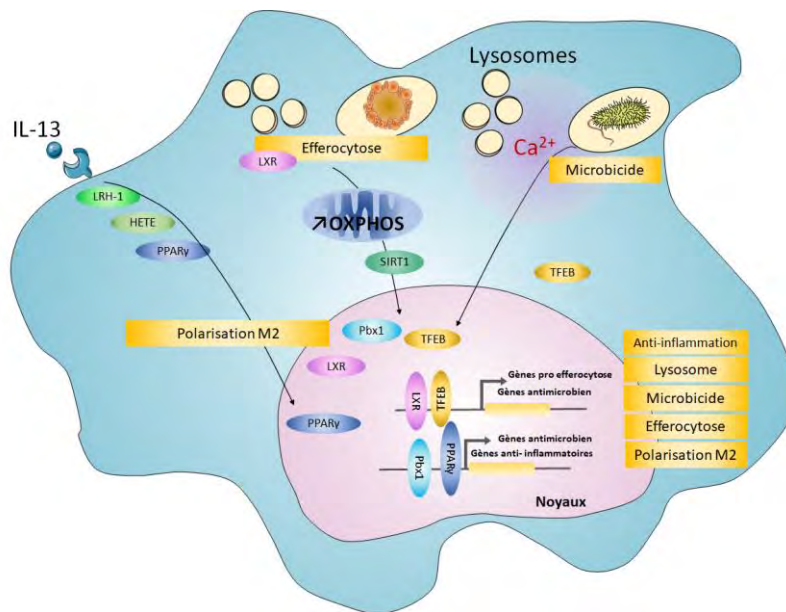
La kinase PIKfyve est essentielle pour le trafic des vésicules au cours de la phagocytose (S. H. Min et al. 2019). Chez les macrophages PIKfyve<sup>-/-</sup> le trafic du lysosome est altéré et le compartiment endolysosomal est encombré à cause d'une dégradation protéolytique limitée (PIKfyve<sup>fl/fl</sup> LysM-Cre). Ceci provoque chez l'animal une hépatosplénomégalie et une inflammation systémique (S. H. Min et al. 2019). Sans le recrutement des lysosomes au phagosome, ce dernier se rompt. Ceci provoque l'activation de l'inflammasome qui libère l'IL-1 $\beta$  et tue la cellule, permettant au *C. Albicans* de s'évader (Westman et al. 2020).

La biogenèse des lysosomes est principalement assurée par l'activation du facteur de transcription TFEB (Austermeier et al. 2020). Lors de la première phagocytose, se met en place un set de gènes pro-lysosomaux qui améliore les capacités protéolytiques de macrophages par rapport à celles de macrophages naïfs. Cette reprogrammation génique passe par la nucléarisation du facteur TFEB, dépendante de la libération de Ca<sup>2+</sup> lysosomale via le canal MCOLN1 présent sur le phagosome (M. A. Gray 2016). L'activation des FdT (facteur de transcription) comme TFEB et TFE3 est importante pour la défense contre les pathogènes. Ces deux FdT collaborent pour promouvoir l'autophagie, la biogenèse des lysosomes, et la synthèse de cytokines inflammatoires au cours d'une réaction inflammatoire (Pastore et al. 2016). L'autophagie intervient aussi dans le processus de phagocytose de *C. Albicans* (Herb 2020). De la même façon, un défaut d'autophagie, médié par la délétion du facteur nucléaire HMGB1 spécifiquement dans les cellules myéloïdes, induit chez les animaux une vulnérabilité face aux infections de *Listeria monocytogenes* et augmente la tempête cytokiniques (IL-1 $\beta$  et IL-18) par rapport aux animaux WT (Yanai et al. 2013).

A noter qu'il existe aussi une part dans l'élimination du pathogène, dépendante des mitochondries (Davies et al. 2017). L'étude de Davies et collègues révèle que les mitochondries des macrophages péritonéaux, se regroupent autour du phagosome (contenant *Saccharomyces cerevisiae*), et par une CTE (chaîne de transport des électrons) fonctionnelle contribuent à son élimination *in vitro* (Davies et al. 2017). Ce « comportement » mitochondrial, visant à encercler le phagosome est aussi retrouvé dans le cas de *Toxoplasma gondii*, permettant son élimination par la production de ROS, et en inhibant son accès aux réserves de nutriments cellulaire (Pernas et al. 2018).

Le récepteur nucléaire LRH-1 (Liver receptor homologue-1) est impliqué dans la répression de l'inflammation des macrophages, et son expression est induite sous l'influence de l'IL-13 via l'action du FdT STAT6 (Lefèvre et al. 2015). Son absence dans les macrophages LRH-1<sup>-/-</sup> (Liver receptor homologue-1) altère leur capacité à acquérir le phénotype M2 (en présence d'IL-13) par défaut de synthèse d'un ligand lipidique (15-HETE pour (acide hydroxy-eicosatétraénoïque)) qui permet la liaison et l'activation de PPAR $\gamma$ . Cette incapacité à devenir M2 limite aussi leur capacité à éliminer *C. albicans* (Lefèvre et al. 2015).

Les macrophages lors d'une infection par *C. Albicans* de profonds changements qui permettent d'améliorer l'élimination du pathogène, en améliorant les capacités de phagocytose. Cette dernière est retrouvée active aussi chez les macrophages qui réalisent l'éfferocytose. Ensemble, les macrophages qui phagocytent (des ACs ou des pathogènes comme *C. Albicans*) présentent une activation dite alternative (m2) qui améliore les capacités de phagocytose, et stimule la biogenèse des lysosomes. On peut donc retenir que des mécanismes aussi différents que la phagocytose d'un pathogène et la lutte contre la tempête cytokinique impliquent tous les deux un mécanisme commun; la machinerie de phagocytose (lysosomes, vésicules et dynamique d'adressage). Celle-ci passe par des régulations géniques avec des FdT (TFEB et PPAR $\gamma$  et LRX etc...) qui vont aussi agir pour ajuster le phénotype (la polarisation) du macrophage pour lui permettre d'être le plus efficace dans la condition biologique donnée.



**Figure 13: La phagocytose orchestre diverses fonctions essentielles du macrophage.** La polarisation M2 (induite par des cytokines) favorise l'activation de PPAR $\gamma$  qui polarise le macrophage en faveur de l'expression d'une polarisation M2 (anti inflammatoire) et améliore aussi sa détection et élimination des pathogènes (antimicrobien). L'efférocytose permet elle aussi la polarisation M2 du macrophage par une action métabolique. Elle active le métabolisme des OXPHOS et de la FAO à l'aide de FdT comme LXR et Pbx1 (pour pre-B cell leukemia transcription factor-1). La phagocytose permet aussi l'élimination du pathogène *C.albicans*, ceci par recrutement des lysosomes et activation du FdT TFEB permettant une polarisation du macrophage pour une activité bactéricide efficace. Illustration bilan des publications de Lise Lefèvre (Toulouse - France) (Lefèvre et al. 2015) ; Stanley Ching-Cheng Huang (saint Louis - USA) (S. C.-C. Huang et al. 2014) ; Shuang Zhang (Chicago -USA) (S. Zhang et al. 2019) ; Manon Viaud (Nice -France) (Viaud et al. 2019) ; Johannes Westman (Toronto - Canada) (Westman et al. 2020).

## 2. Les traitements du choc septique

Dans les années 1960 le premier essai clinique « immunosuppresseur » consiste à diminuer la réponse inflammatoire avec l'utilisation de corticostéroïdes mais sans effet bénéfique notable (Bennett et al. 1962). L'hypothèse de limiter l'inflammation pour réduire la mortalité n'apporte pas un succès tangible car elle présente plus de mortalité lors de la seconde phase immunosuppressive (Nedeva, Menassa, et Puthalakath 2019). Les recherches dans ce sens ont continué jusqu'aux années 2000 sans bénéfice notable sur la survie des patients (Polat et al. 2017; Abraham et al. 2001; Crum, Lederman, et Wallace 2005).

A l'inverse, des thérapies « immuno stimulatrices » essayent de limiter la paralysie immunitaire qui survient dans le second temps en restaurant l'immunocompétence via l'utilisation d'HGFs (Hematopoietic Growth Factors) sans pour autant présenter de réelles améliorations cliniques jusqu'à ce jour (Meisel et al. 2009; Chousterman et Arnaud 2018). Les pistes comme celles du facteur de croissance des monocytes et neutrophiles (GM-CSF) (Meisel et al. 2009; Mathias et al. 2015) ou l'IL-17 (Chousterman et Arnaud 2018), ou encore le PD-1 (Shindo et al. 2015) ont étudiées, et semblent prometteuses, mais demandent davantage de recherches et de mieux caractériser le type de sepsis.

Le sepsis a pour conséquence d'entraîner un œdème, une hypotension systémique et les MODS (Aird 2003). London et collègues expliquent que l'activation et la perméabilité des cellules endothéliales sont des éléments centraux dans l'installation de l'œdème, des MODS et de la mortalité dans de multiples modèles d'infection (London et al. 2010). En renforçant les jonctions des cellules endothéliales entre elles, les auteurs ont observé une diminution de la perméabilité vasculaire associée à une diminution des dommages tissulaires liés à la tempête cytokinique et une amélioration de la survie des animaux (London et al. 2010).

Il existe donc un lien entre la plasticité des macrophages et le déroulement physiologique d'une réaction immunitaire. Cette plasticité est la résultante de plusieurs paramètres, comme l'origine embryonnaire, le microenvironnement et le métabolisme intracellulaire.

## B. Origines, diversité et localisation des macrophages

### I. Ontogénie, diversité et localisation

#### 1. Ontogénie et hétérogénéité des populations de macrophages

Les macrophages résidents sont présents dans l'ensemble des tissus de l'organisme et présentent une hétérogénéité ontogénique. Pendant des années, le dogme en vigueur était que les macrophages résidents étaient tous issus des monocytes circulants et donc d'un progéniteur hématopoïétique post-natal.

Ce concept a été remis en question dans les années 2010, suite à la découverte de précurseurs embryonnaires à l'origine de populations de macrophages dits résidents dans le cerveau (les cellules de la microglie) ou de l'épiderme (les cellules de Langerhans) (Hoeffel et Ginhoux 2018). Il est bien accepté à présent, que la plupart des macrophages résidents sont issus d'une vague de progéniteurs érythro-myéloïdes (EMPs pour erythro-myeloid progenitors) provenant du sac vitellin au cours de l'embryogenèse (Hoeffel et Ginhoux 2018).

Chez le modèle murin, l'hématopoïèse embryonnaire se subdivise en 3 vagues successives avec :

- Une vague primitive de précurseurs érythro-myéloïdes issue du sac vitellin au jour E7.5 exprimant le récepteur au M-CSF. Ces précurseurs érythro-myéloïde vont permettre l'émergence de divers cellules dont les cellules gliales (**voir figure 12 « cellules en vert »**) (Ginhoux et al. 2016).

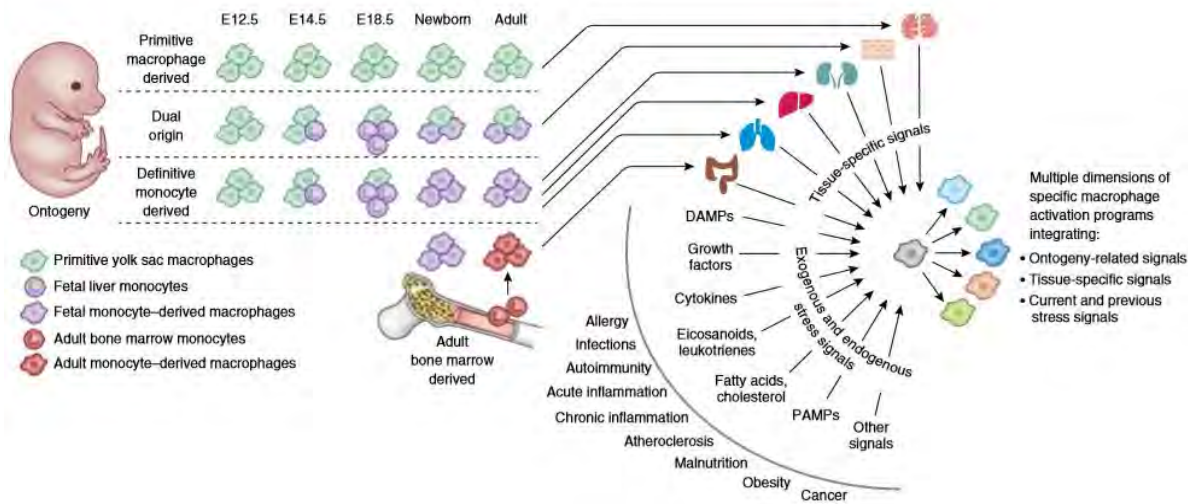
- Une seconde vague, dite « transitoire définitive », est issue de l'endothélium hémogénique. Cette vague produit les précurseurs érythro-myéloïdes qui migreront vers le foie fœtal lors de la mise en place du système vasculaire sanguin au jour E8.5. Ces progéniteurs, une fois dans le foie fœtal vont permettre l'émergence des KC du foie et des AMs des poumons (**voir figure 12 « cellules en violet »**) (Ginhoux et al. 2016). Les AMs sont les macrophages principaux du poumon et résident dans la lumière de l'espace aérien, où ils recyclent le surfactant et éliminent les particules et débris. Les AMs sont très dépendantes du GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et du TGF- $\beta$  pour leur survie (Guilbaud, Gautier, et Yvan-Charvet 2019).

- Une troisième vague, dite « définitive », issue de l'endothélium hémogénique du sac vitellin, formant des cellules souches hématopoïétiques (c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup>) au jour E10.5, dans l'aorte, les gonades et le mésonéphros. Ces précurseurs établiront l'hématopoïèse définitive du foie fœtal puis de la moelle osseuse. Ces cellules vont coloniser le cœur et l'intestin (Voir Figure 14, les cellules rouges).

L'essentiel des études évalue l'ontogénie des macrophages murins et non celle des macrophages humains. De fait, la transposabilité des données reste encore de l'ordre de l'extrapolation. En termes de phénotype, les macrophages murins résidents expriment les marqueurs F4/80, CD64, CD14. Mais ils expriment aussi des marqueurs spécifiques, tels que *Sall1* pour la microglie, *Clec4f* pour les KC, *Car4* pour les macrophages alvéolaires, *Tgfb2* pour les macrophages péritonéaux, *CD74* pour les macrophages de l'iléon et du côlon, et enfin *Ccr2* pour les monocytes du sang (Lavin et al. 2014). A l'âge adulte, les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse sont capables de réaliser l'hématopoïèse. Cependant la moelle osseuse n'est pas le seul organe à pouvoir réaliser l'hématopoïèse. Le tissu adipeux contient aussi des cellules souches dans son stroma qui ont la capacité de donner divers types cellulaires par prolifération et différenciation (ostéogénique, adipogénique, myogénique, chondrogénique) (Zuk et al. 2002). Enfin, dans de plus modestes proportions, il a été découvert d'autres capacités prolifératives

des macrophages au sein du tissu adipeux au cours de l'obésité, indépendamment de l'afflux de monocytes de la circulation sanguine (Amano et al. 2014).

Le macrophage est une cellule plastique par de multiples aspects (sécrétions, phagocytose), il faut intégrer à présent l'influence de l'ontogénie des signaux environnementaux, ainsi que la dimension temporelle pour avoir une représentation réaliste de la diversité des macrophages (**Figure 14 ci-dessous**). En conséquence, une stimulation « identique » appliquée à deux populations de macrophages différents aboutira à une réponse différente entre les deux populations étudiées.



**Figure 14: Modèle intégratif et multidimensionnel de l'origine embryonnaire des macrophages.** Une vue d'ensemble de l'activation des macrophages est présentée avec leur ontogénie, leurs tissus de résidence et les signaux du microenvironnement (spécifique à chaque tissu). Ceci agissant sur la réponse et l'activation du macrophage. Les macrophages de la microglie dérivent du sac vitellin. Les macrophages alvéolaires ou les cellules de Kupffer sont issus des monocytes dérivés du foie fœtal. Les cellules de Langerhans ont une origine mixte entre le sac vitellin et les monocytes issus du foie fœtal. Les macrophages de l'intestin, du cœur et du derme sont remplacés à la naissance par des monocytes dérivés de la moelle osseuse. Le micro environnement, lui aussi, influence directement l'activation du macrophage au cours des processus physiologiques. Lors d'une lésion, des modifications du microenvironnement sont perçues et déclenchent une réponse spécifique. Ainsi un même signal de stress avec la même cinétique aura des résultats différents en fonction de quelle population est interrogée. "E" signifie le nombre de jours du développement embryonnaire. Issue de Ginhoux et collègues (Singapour- Singapour) (Ginhoux et al. 2016).

## 2. Diversité et fonctionnalité des macrophages

En plus de présenter une grande hétérogénéité, les populations sont capables de communiquer entre elles (Hoyer et al. 2019). De façon remarquable, l'équipe du Dr. Mathias Nahrendorf a récemment démontré qu'une lésion locale génère à distance l'activation de macrophages pouvant produire des effets bénéfiques ou délétères.

Par exemple, suite à un sepsis, un infarctus, ou un AVC, (accident vasculaire cérébral), l'inflammation systémique est capable d'induire une prolifération des macrophages résidents dans les autres tissus à distance. De plus, à la suite d'un infarctus du myocarde, les auteurs ont décrit davantage de transcrits relatifs à la prolifération cellulaire des AMs, qui sont alors plus efficaces face à une infection pulmonaire par l'agent *Streptococcus Pneumoniae*. L'infarctus du myocarde protège donc les souris face à une infection pulmonaire (Hoyer et al. 2019). Cette amélioration de la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires passe par une réponse IFN $\gamma$  dépendante (Hoyer et al. 2019). Ce travail étaye le concept très intéressant des communications inter-tissulaires entre les différentes populations de macrophages lors d'une inflammation ou d'une atteinte tissulaire via des médiateurs solubles comme l'IFN $\gamma$ .

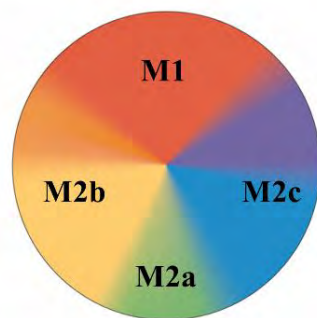
Mais les macrophages ont aussi en commun certains mécanismes comme ceux régulant leur survie et leur prolifération. Le M-CSF (CSF-1) permet la survie, la prolifération, la mobilité et la sécrétion de cytokines par les monocytes et macrophages (van Riet et al. 2020). Cette molécule est synthétisée par presque tous les tissus de l'organisme. En condition normale, il est retrouvé dans le sang à une concentration de 9 ng/ml chez la souris et de 2,4 ng/ml chez l'Homme. Cette concentration augmente lors d'infection (Gow, Sester, et Hume 2010). Les souris déficientes en M-CSF (*op/op*) présentent des déformations osseuses, des défauts dentaires, des défauts de croissances de la rate, de faibles quantités de macrophages, des défauts de reproduction, des défauts neuronaux, et une espérance de vie diminuée (Gow, Sester, et Hume 2010). Ceci prouve encore une fois l'importance des macrophages dans la physiologie par leur fonction de phagocytose. Le M-CSF et le GM-CSF induisent tous deux l'activation des macrophages. Le M-CSF, bien que très important pour la survie des macrophages, n'a qu'un faible impact sur leur polarisation des macrophages chez l'Homme par rapport à d'autres molécules bien plus puissantes pour induire une polarisation (Jaguin et al. 2013) (Murray et al. 2014) (van Riet et al. 2020). Cependant, il est expliqué dans la littérature que GM-CSF induit un phénotype M1 et que le M-CSF induit un phénotype M2 sur des BMDM en culture (Satoh et al. 2010). Effet du M-CSF confirmé par l'équipe du Dr. Dapin Fan qui a publié en 2017 un article sur la polarisation M2 des TAM (tumors associated macrophages) médiée par M-CSF libéré par les cellules tumorales.

Cependant, ils n'ont pas précisé la part de polarisation M2 dépendante du M-CSF au regard d'autres cytokines comme le TGF- $\beta$  ou l'IL-10 qui sont bien plus prégnantes dans cette polarisation M2, et qui sont elles aussi libérées par les cellules tumorales. Chez le rongeur de laboratoire, l'utilisation d'inhibiteurs des voies de la polarisation M2 reverse le phénotype M2 des TAM et diminue la taille des tumeurs (Guilbaud, Gautier, et Yvan-Charvet 2019).

La polarisation des macrophages, qu'elle soit dépendante des signaux de l'environnement ou bien induite pharmacologiquement, est déterminante dans la physiopathologie. Elle est le siège de plusieurs mécanismes de régulation que je vous présente ci-dessous.

## II. La polarisation des macrophages

Il existe différents termes pour l'état de polarisation : les M1, M2a, M2b, M2c et les MMe « metabolically-activated ». Ils font tous parti d'un continuum de phénotype (Mantovani et al. 2004) (Coats et al. 2017).



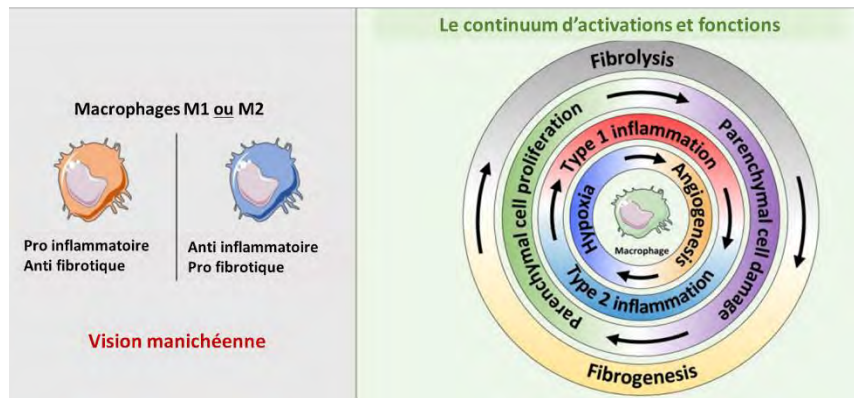
**Figure 15 : Le Continuum des polarisations des macrophages.** Les différentes populations de macrophages sont représentées avec différentes couleurs. Le rouge pour les macrophages avec une activation dite classique « M1 ». Les couleurs froides représentent les polarisations M2a ou M2c, induites par IL4 et IL13 ou par l'IL-10 respectivement. Les formes M2b et M2a ont plus des fonctions immunorégulatrices, et favorisent les réponses de types Th2. Alors que la forme M2c est plus impliquée dans la suppression de la réponse immunitaire et le remodelage tissulaire. Adapté de Mosser et collègues (Maryland –USA) (Mosser et Edwards 2008) et Mantovani et collègues (Milan –Italie) (Mantovani et al. 2004)

L'appellation M1 ou M2 fait historiquement référence à la classification des lymphocytes Th1 et Th2 et de leur influence sur les macrophages (Martinez et Gordon 2014). En accord avec cette nomenclature, la polarisation des macrophages est divisée en deux sous-types :

Les macrophages M1, induits par les cytokines des lymphocytes Th1 (IFN $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) et les macrophages M2 induits par des cytokines des lymphocytes Th2 (IL-4 et IL-13) (C. D. Mills et al. 2000) (Murray et al. 2014). Les études *in vitro* concernant l'action des différentes cytokines qui polarisent en M2, ont mis en évidence divers phénotypes de polarisation au sein des M2. Nous distinguons les M2a (par l'IL-13 ou l'IL-4), les M2b (par l'IL-10) et les M2c (induit par complexe immunitaire en présence d'LPS) (Mantovani et al. 2004). L'activation des macrophages est étroitement liée aux reprogrammations métaboliques (Batista-Gonzalez et al. 2020) et transcriptionnelles (Xue et al. 2014) (**Voir figure 14 ci-dessus**).

Les macrophages M1 sont glycolytiques (production rapide d'ATP) et synthétisent des lipides (médiateur inflammatoire). Alors que les M2, oxydent les lipides avec la FAO *via* leur OXPHOS (Batista-Gonzalez et al. 2020).

Néanmoins, dans des contextes comme le diabète ou l'obésité (C. Li et al. 2019) mais aussi les infarctus du myocarde, les sepsis ou les AVC (Hoyer et al. 2019) le concept « M1 ou M2 » est insuffisant pour décrire l'activation de ces macrophages (**Voir figure 14 ci-dessous**).

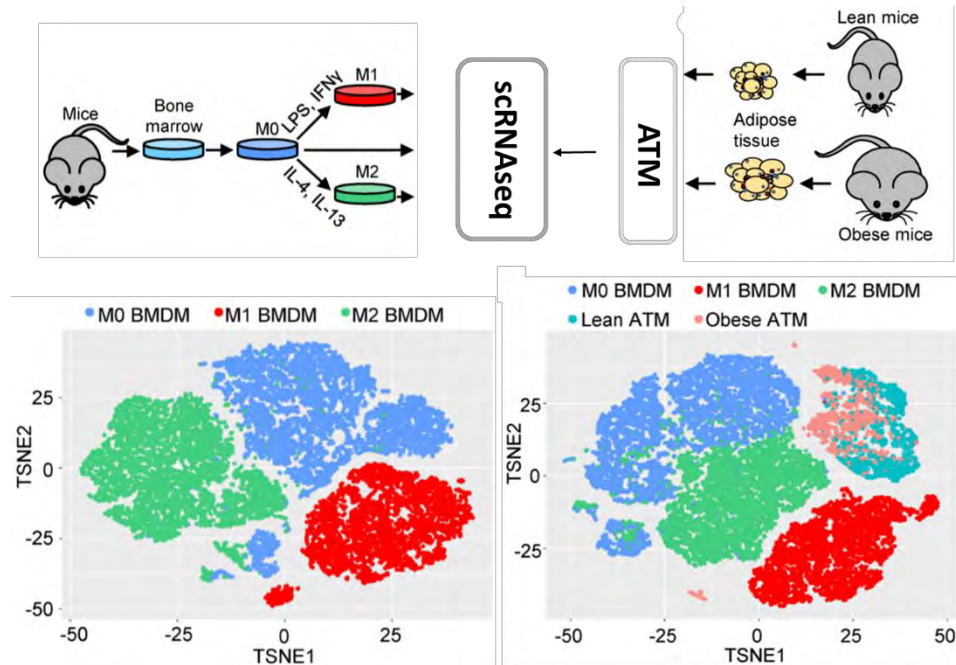


**Figure 16 : Évolution du dogme des polarisations des macrophages** : la vision simpliste d'une polarisation opposée de type M1 vs M2 est réévaluée pour montrer une continuité dans les divers phénotypes décrits. Ces divers phénotypes, dépendent eux des multiples voies d'activations auxquelles ils sont sujets, lors des étapes de la physiopathologie. Issue de Guillot et de ses collègues (Bethesda –USA) (Guillot et Tacke 2019).

L'équipe de Beiyan Zhou a publié en 2019 une étude révélant, par une approche de **single cell RNA-Seq**, l'hétérogénéité entre une culture de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM pour Bone Marrow Derived Macrophages) de type M0 (Naïf), M1 (100 ng/ml LPS et 50 ng/ml IFN $\gamma$ ) ou M2 (20 ng/ml IL-4 et 20 ng/ml IL-13) et des macrophages dérivés du tissu adipeux (ATM) de souris saines ou obèses (C. Li et al. 2019) (**Voir figure 15**)

L'analyse de l'hétérogénéité des BMDM en culture est nette. Les trois amas de cellules (M0 « bleu », M1 « rouge » et M2 « vert ») ségrègent séparément et de façon compacte, preuve que les cellules au sein d'un même groupe se ressemblent et qu'elles sont significativement différentes de celles des autres groupes (**Panel de Gauche sur la figure 15**). Pour l'analyse de l'hétérogénéité des BMDM avec les ATM de souris normo pondérées ou obèses, cela se complexifie. Les cellules issues des tissus adipeux de souris normo-pondérées ou obèses se regroupent dans un même amas, avec une régionalisation dépendante de leur origine (obèse ou mince). Elles sont aussi très différentes des BMDM, comme le montre l'espace qui les sépare entre les amas vert (M2) et bleu (M0). Ceci démontre que les polarisations *in vitro* sont différentes de celles retrouvées *in vivo*. *In vivo*, la polarisation des macrophages est plus complexe, de par le microenvironnement et l'état métabolique.

Ajouté à cela, il faut prendre en compte l'effet du fond génétique des animaux. Les macrophages des souris *C57Bl/6* en présence de LPS vont cataboliser l'arginine en NO et en citrulline (métabolite de type M1). Alors que le même traitement au LPS sur des macrophages de souris *BALB/c* produit une activation de type M2-like, qui induira la synthèse de l'ornithine sans production de NO ou de citrulline (C. D. Mills et al. 2000). Tout ceci souligne la complexité d'une transposition des mécanismes identifiés chez un fond génétique précis de souris, à l'Homme.



**Figure 17 : Illustration de l'hétérogénéité des macrophages *in vivo*; *in vitro* au niveau cellulaire.** Distribution par t-SNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) des analyses par single cell RNA-seq, des BMDM (M0), (M1), (M2) et des macrophages provenant des tissus adipeux de souris saines ou obèses. Chaque sous populations de macrophage ségrègent séparément avec une distance entre deux points qui est proportionnelle à la différence d'expression génique entre eux. Ainsi les M2 (en vert) sont très séparés des M1(en rouge) et les M0 (en bleu) sont entre les deux polarisations antagonistes (t-SNE de gauche). D'autres parts, les ATM (Adipose Tissue Macrophages) sont regroupés en un pool qui se subdivise en deux pôles par la distribution des ATM provenant de souris saines (en turquoise) ou des ATM provenant de souris obèses (rose pâle) (t-SNE de droite). Issue de Li et collègues (Farmington-USA) (C. Li et al. 2019)

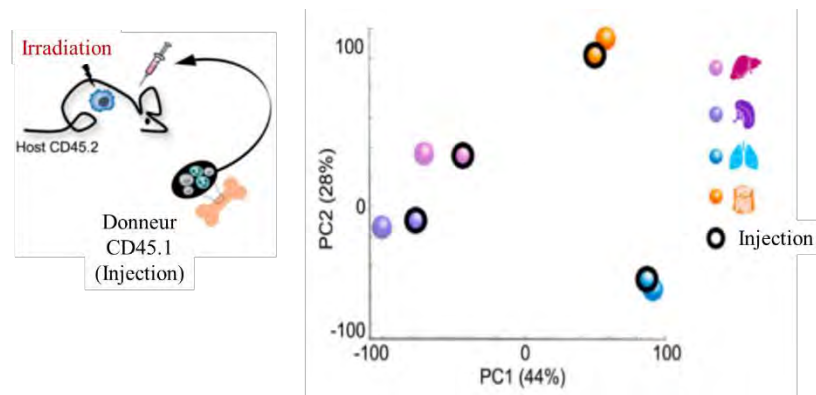
## 1. L'impact de l'environnement

L'environnement régule le niveau des marques épigénétiques suivantes H3K4me3 (promoteur), et H3K27ac (active enhancer) dans les macrophages (Lavin et al. 2014). L'équipe d'Ido Amit a observé que l'identité du macrophage est dictée par son origine embryonnaire et son microenvironnement (Lavin et al. 2014). Dans cette publication, Yonit Lavin et ses collaborateurs montrent le rôle majeur du microenvironnement dans l'acquisition du phénotype des différentes familles de macrophages (**Voir figures 17**).

Chez des souris irradiées, une greffe de cellule de moelle osseuse va coloniser les différentes niches des différents organes, et acquérir de façon très similaire, les propriétés et phénotypes des cellules immunes résidentes initiales. Plus précisément, des souris avec une expression du CD45 (isotype 1, CD45.1) sont irradiées, et transplantées avec des cellules de moelle osseuse issues de souris avec une expression de CD45 (isotype 2, CD45.2). Le greffon va alors coloniser la moelle osseuse ainsi que de nombreux organes comme le foie, les poumons et la rate (Lavin et al. 2014).



Cette étude révèle le rôle du microenvironnement dans l'acquisition du phénotype des macrophages, corroborée en 2015 par les recherches de Charlotte Scott dans l'équipe de Martin Williams. Elle explique que les monocytes circulant du sang peuvent, une fois dans le foie, acquérir les mêmes caractéristiques, au moins sur le plan transcriptionnel, que les macrophages résidents, les KC (Scott et al. 2016).



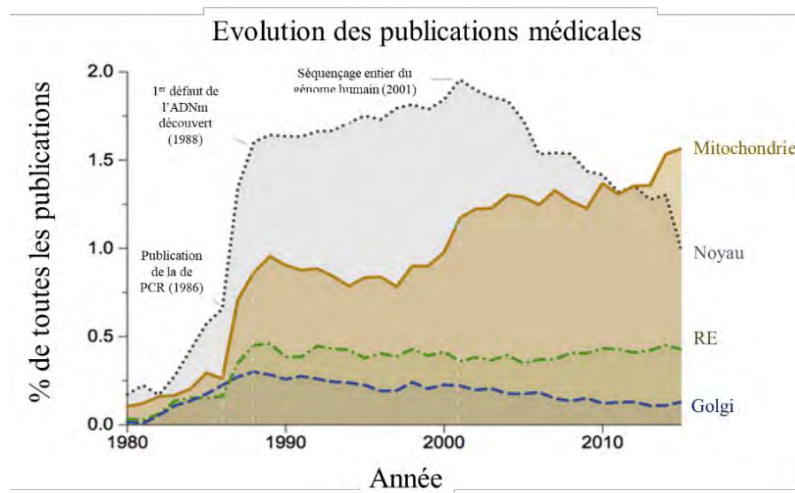
**Figure 18 : Le microenvironnement façonne les macrophages.** Gauche : schéma expérimental. Injection de BMDM dérivée d'une souris avec une isoforme de type CD45.1 dans une souris hôte dont l'isoforme est CD45.2. Droite : Représentation en PCA sur l'expression de l'enhancer H3K4me1 chez les macrophages transplantés (CD45.1) par rapport aux macrophages résidents (CD45.2) de quatre tissus différents. Issu de Lavin et de ses collègues (New-York –USA) (Lavin et al. 2014).

Toutefois il reste un autre élément à prendre en compte pour expliquer l'hétérogénéité des macrophages dans son ensemble. Il s'agit du métabolisme cellulaire. Le métabolisme est considéré comme l'ensemble des réactions anaboliques et cataboliques qui se déroulent à l'intérieur de la cellule. Le siège principal du métabolisme cellulaire est la mitochondrie, un organite au cœur d'intenses recherches visant à comprendre son rôle dans diverses maladies comme les cancers, les maladies auto-immunes, inflammatoires, et métaboliques.

### C. La mitochondrie : un organite central dans la destinée du macrophage.

La mitochondrie est une organelle cytoplasmique à double membrane présente dans toutes les cellules eucaryotes de l'Homme (**Voir figure 18**). Le nombre de publications relatives à cette organelle augmente et dépasse à présent le nombre de publications sur d'autres organelles comme le RE (Réticulum Endoplasmique), le Golgi et même le noyau (**Voir figure 17**) (Picard, Wallace, et Burelle 2016). Les mitochondries possèdent leur propre ADN appelé l'ADN mitochondrial (ADNm). Elles sont transmises par le gamète femelle, même si cette idée est remise en doute par une publication de 2018 dans PNAS où les auteurs démontrent, dans des familles avec des maladies génétiques mitochondriales, de façon transgénérationnelle la contribution de l'ADNm maternel et paternel (Luo et al. 2018).

L'ensemble des mitochondries d'une cellule est appelé chondriome. Il est le siège de nombreuses réactions du métabolisme oxydatif dont celles retrouvées dans le Cycle de Krebs (CK), la  $\beta$ -Oxydation des acides gras (FAO). Les mitochondries synthétisent l'ATP grâce aux OXPHOS alimentées par la CTE et le CK situé à la membrane interne mitochondriale (MMI) et dans la matrice mitochondriale. Les mitochondries sont impliquées également dans de nombreux processus tels que l'apoptose, la thermogenèse de non-frisson, la signalisation cellulaire, le stockage du calcium, la prolifération de cellules saines, les cancers et le vieillissement (Czarnecka et al. 2010; Kujoth, Leeuwenburgh, et Prolla 2006; Trifunovic et al. 2004; Rizzuto et al. 2012).



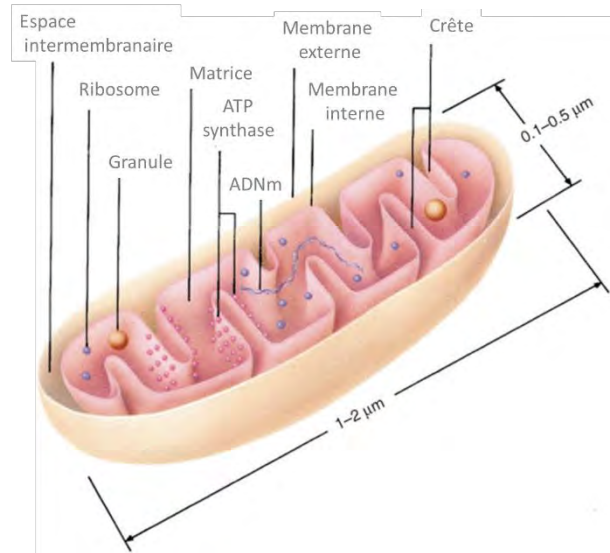
**Figure 19 : Évolution de la proportion des articles publiés depuis 1980 à janvier 2016 en rapport avec divers composants cellulaires.** L'augmentation des publications en lien avec la mitochondrie, fait suite à l'invention de la réaction de polymérase en chaîne (PCR) en 1985, la découverte de la première mutation de l'ADNm date de 1988 et les recherches dans ce domaine augmentent depuis les années 2000. En comparaison, le nombre de publications en lien avec le noyau diminue progressivement depuis le séquençage complet du génome humain en 2001. Illustration issue de Picard et collègues (New-York –USA) (Picard, Wallace, et Burelle 2016).

## I. Origine et composition

Dans les années 1960, Lynn Margulis (puis Sagan) une microbiologiste américaine, a émis l'hypothèse selon laquelle les mitochondries des cellules eucaryotes actuelles proviendraient de l'incorporation par endocytose incomplète d'une alpha-protéobactérie par une cellule proto-eucaryote. Ce phénomène évolutif de symbiose a permis à la cellule hôte d'utiliser l'oxygène pour produire de l'énergie et ainsi de survivre en condition aérobie (M. W. Gray 2017). Aujourd'hui, cette théorie est largement acceptée car plusieurs caractéristiques mitochondriales sont toujours communes aux bactéries. Par exemple, les mitochondries possèdent leur propre ADN (ADNm), circulaire, double brin, plus proche d'un génome procaryote que de l'ADN nucléaire. Elles sont composées de deux membranes de composition différente. La membrane interne de la mitochondrie (MMI) a une composition biochimique proche de celle d'une membrane de bactérie. Alors que la membrane mitochondriale externe (MME) ressemble beaucoup à la membrane d'une cellule eucaryote. Leurs ribosomes mitochondriaux (mitoribosomes) ressemblent aux ribosomes des bactéries. La genèse de nouvelles mitochondries se fait par division de mitochondries pré-existantes. Les mitochondries sont des organites semi-autonomes, c'est-à-dire qu'ils disposent d'un patrimoine génétique propre, capable de se diviser indépendamment du cycle cellulaire nucléaire.

## 1. Structure des mitochondries

La structure et la forme des mitochondries dépendent et varient en fonction de l'état métabolique et du type cellulaire. Les deux membranes délimitent deux compartiments distincts : l'espace intermembranaire, localisé entre les deux membranes et la matrice mitochondriale, au cœur de la membrane interne, dans laquelle nous retrouvons notamment les molécules d'ADNm (**Figure 18 ci-dessous**).

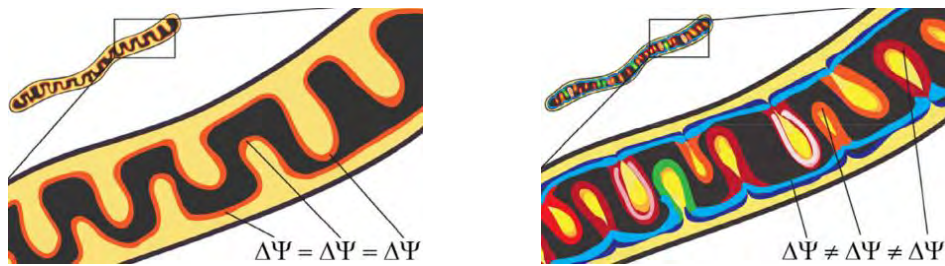


**Figure 20 : Représentation d'une mitochondrie.** Elle illustre les différents compartiments de la mitochondrie, et les différentes membranes qui la constituent et les différents composants. Elle est composée à l'extérieur, de la membrane externe, qui délimite la mitochondrie. Entre la membrane externe et la membrane interne, l'espace présent est appelé espace intermembranaire. La membrane interne délimite l'espace intermembranaire de la matrice. La matrice, au centre de la mitochondrie, possède des ribosomes (mitoribosomes) des granules, l'ADNm, et l'ATP synthase. Illustration issue de Frey et collègues (San Diego-USA) (Frey et Mannella 2000).

Grâce aux premières images obtenues en microscopie électronique, nous avons longtemps considéré les mitochondries comme étant de petits organites isolés.

Cependant, on sait aujourd'hui, grâce à l'avancement des techniques d'imagerie, que les mitochondries constituent en réalité un réseau hautement dynamique qui fusionne et se fragmente en permanence. Une caractéristique nouvelle, concernant ce réseau dynamique, est son hétérogénéité. En effet en 2019, la publication de Julie MacDonald illustre l'hétérogénéité des mitochondries au sein d'une même cellule (MacDonald et al. 2019). Les mitochondries d'une même cellule diffèrent entre elles vis-à-vis de leur taille, ultra-structure, de leur potentiel de membrane ( $\Delta\psi_m$ ), et du nombre de copie d'ADNm qu'elles renferment (MacDonald et al. 2019).

Pour aller plus loin dans l'hétérogénéité, il a été démontré l'existence d'une hétérogénéité de production d'ATP entre les différentes crêtes d'une même mitochondrie, ceci par la mesure de différents potentiels de membrane au sein d'une même mitochondrie (Wolf et al. 2019). Ici, la structure des crêtes mitochondriales confère la fonction et la qualité d'OXPHOS. Les auteurs présentent la mitochondrie comme une somme de potentiels de membrane spécifique à chacune de ses crêtes. La mitochondrie devient alors la somme de diverses unités indépendantes de production d'ATP, les crêtes mitochondriales. L'aspect ouvert ou fermé des zones de jonctions des crêtes influence la distribution des composants des OXPHOS au sein de ces dernières (Wolf et al. 2019). Les complexes de la CTE et l'ATP synthase se retrouvent préférentiellement dans les crêtes plutôt que sur la face de l'IMM en contact avec l'OMM.



**Figure 21 : Représentation de l'évolution du modèle de distribution du potentiel de membrane dans une mitochondrie.** A gauche : la vision d'un équipotentiel de membrane, avec des crêtes ouvertes et une distribution uniforme des complexes mitochondriaux. A droite : la nouvelle vision, celle d'un potentiel de membrane différent entre chaque crête. La crête est l'unité fonctionnelle autonome et cloisonnée, qui exhibe un potentiel de membrane précis et une production d'ATP propre. Illustration issue de Wolf et collègues (Los Angeles-USA) (Wolf et al. 2019).

### 1.1. La membrane mitochondriale externe (MME)

La membrane externe est une bicouche lipidique dont la composition est proche de celle de la membrane plasmique. Cette membrane est riche en porine appelée VDAC (Voltage Dependent Anion Channel). Les porines sont des protéines membranaires qui forment des canaux permettant le passage passif d'ions et de petites molécules organiques solubles de masse moléculaire inférieure ou égale à 1 kDa (ions, acides gras, pyruvate, nucléotides...). Les molécules dont la taille est supérieure à 1 kDa traversent cette membrane à l'aide de transporteurs comme le complexe protéique TOM (« Transporter Outer Membrane »). Il reconnaît les séquences d'adressage mitochondrial codées par le génome nucléaire et destinées à l'adressage mitochondrial (J. Hoogenraad, Michael T. Ryan 2001).

### 1.2. La membrane mitochondriale interne (MMI)

C'est au travers de cette bicouche lipidique que se fait le transport de proton, qui permet la synthèse d'ATP (Frey et Mannella 2000). Elle présente une grande surface et plusieurs replis qui définissent les crêtes mitochondriales. On distingue, de la MMI, parallèle à la MME, les crêtes qui forment des protrusions dans la matrice mitochondriale. La délimitation entre la MMI et les crêtes s'appelle la zone de jonction des crêtes. Cette MMI possède un phospholipide spécial, la cardiolipine. Il est localisé sur la face interne de la MMI, au contact direct de la matrice. Elle est composée de quatre chaînes d'acide-gras, qui confèrent à la membrane une étanchéité face aux ions et la capacité à réaliser des courbures (Mayr 2015).

### 1.3. L'espace inter-membranaire

L'espace intermembranaire (IMS pour intermembrane space) est un compartiment où transitent les molécules de taille inférieure à 10 kDa qui ont traversé la membrane externe. Il est fortement concentré en protons et contient de nombreuses protéines qui ont des rôles importants dans la physiologie cellulaire, comme le cytochrome c et les pro-caspases impliqués dans l'apoptose.

## 1.4. La matrice mitochondriale

La matrice mitochondriale contient de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique comme celle du cycle de Krebs (Martínez-Reyes et Chandel 2020), de la  $\beta$ -Oxydation des acides gras (Houten et Wanders 2010) et enfin de la céto-genèse (Laffel 1999). Elle possède également plusieurs copies d'ADN mitochondrial ainsi que les composants nécessaires à son métabolisme : ARNs ribosomiques et ARNs de transferts, nucléotides phosphates (ADP, ATP), mitoribosomes et toutes les enzymes intervenant dans les étapes de réplication, transcription, traduction et réparation de l'ADNm.

### a. Génome mitochondrial : l'ADNm humain

L'origine endosymbiotique des mitochondries explique que ces organites possèdent leur propre génome et leur propre code génétique, différent de celui de l'ADN nucléaire. L'ADNm est une molécule bicaténaire, circulaire et il code pour :

- 22 ARN de transfert (ARNt), pour la traduction mitochondriale
- 2 ARN ribosomiques (ARNr 12S et 16S), qui composent les mitoribosomes
- 13 sous-unités protéiques appartenant à quatre des cinq complexes de la CTE :
  - Pour le complexe I : ND1 à ND6 et ND4L.
  - Pour le complexe III : Cytochrome b.
  - Pour le complexe IV : COX1 à COX3.
  - Pour le complexe V : ATPase 6 et 8.

Le complexe II est entièrement codé par des gènes nucléaires et ses sous-unités sont importées dans la mitochondrie, après traduction cytosolique, grâce à un signal d'adressage (Greaves et al. 2012).

## II. Le fonctionnement et production d'énergie par la mitochondrie

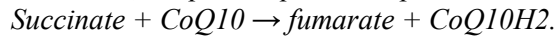
Les mitochondries sont considérées comme de véritables centrales énergétiques pour produire de l'ATP. Chaque jour, un homme adulte synthétise et utilise environ 40 kg d'ATP (Grivennikova et Vinogradov 2013). En aérobie, les mitochondries produisent la majorité de l'ATP nécessaire aux cellules grâce aux OXPHOS. La CTE est composée de cinq complexes enzymatiques massifs. Les quatre premiers (I, II, III, IV) constituent la CTE et sont couplés à un cinquième complexe enzymatique l'ATP synthase (F<sub>0</sub> et F<sub>1</sub> ATPase), qui catalyse la production d'ATP, il est le siège des OXPHOS qui synthétisent l'ATP. Les électrons capturés à partir de molécules donneuses vont circuler au travers des quatre premiers complexes grâce à des réactions d'oxydo-réduction en générant une force électromotrice. Ces électrons vont être acheminés jusqu'à l'accepteur final d'électrons : l'oxygène qui va devenir de l'eau, au niveau du complexe IV. Le transfert d'un électron s'accompagne de la translocation d'un proton de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV, créant ainsi une force protomotrice. Cette force protomotrice va permettre la rotation de l'ATP-synthétase pour synthétiser l'ATP à partir d'ADP (adénosine diphosphate) et de phosphate inorganique (Pi) en réalisant une liaison phosphoanhydride sur le dernier phosphate de l'ADP (**Voir figure 20**).

### 1. Les complexes mitochondriaux

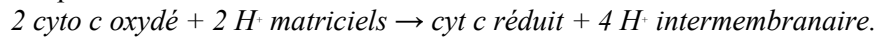
**Le complexe I = NADH déshydrogénase**, premier complexe enzymatique de la CTE. Il est composé de 45 sous-unités dont 7 sont codées par l'ADNmt (ND1 à ND6 et ND4L). Il oxyde le NADH en NAD<sup>+</sup>. Il est aussi une source importante de ROS mitochondriaux. En parallèle, il permet le passage de protons H<sup>+</sup> de la matrice vers l'espace intermembranaire :



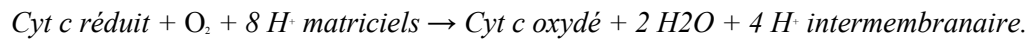
**Le complexe II = Succinate déshydrogénase**, est totalement codé par le noyau. Il est constitué de quatre sous-unités dont une impliquée dans le Cycle de Krebs. Il est aussi une source importante de ROS mitochondriaux. Il oxyde le succinate en fumarate. Cette réaction libère moins d'énergie que l'oxydation du NADH, ce qui fait que le complexe II ne contribue pas à la génération du gradient de protons.



**Le complexe III = Cytochrome C réductase** est composé de 10 sous-unités environ. Il transfère les électrons aux molécules de cytochrome c (cyt c) localisées dans l'espace intermembranaire entraînant ainsi leur réduction. Il est aussi une source importante de ROS mitochondriaux. Il transfère également des protons à travers la membrane.

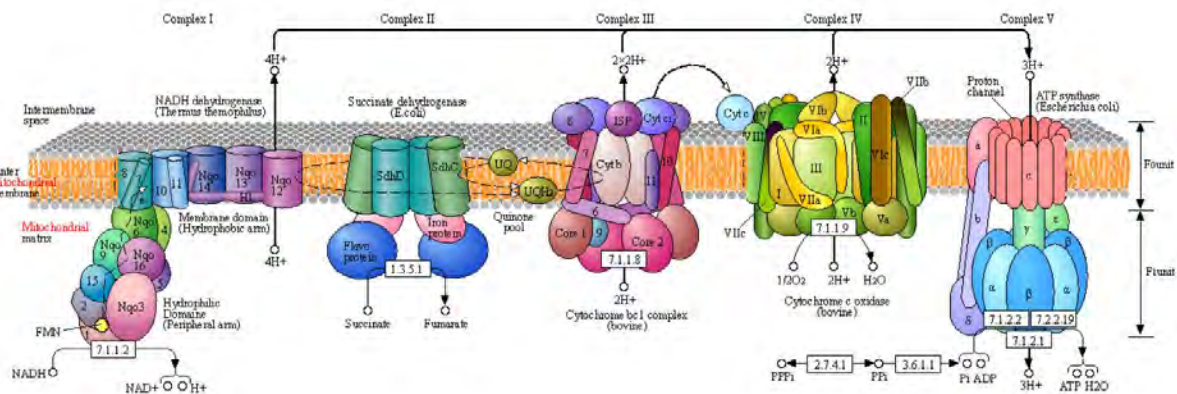


**Le complexe IV = cytochrome C oxydase** est un complexe protéique de 200 kDa composé de 13 sous-unités. Grâce à son site de liaison avec l'oxygène, il transfère des électrons du cyt c à l'oxygène moléculaire pour produire de l'eau tout en oxydant le cyt c. Il transfère également des protons à travers la membrane.



**Le complexe V = l'ATP Synthétase** est composé de 2 sous-unités principales : F0 et F1. F1 est associée à F0 du côté de la matrice mitochondriale. Le complexe F0 F1 de l'ATP synthase utilise le gradient de proton pour synthétiser des molécules d'ATP via les OXPHOS. La composante F0 joue le rôle d'un canal ionique permettant le retour des protons dans la matrice mitochondriale. Pendant ce retour des protons, l'énergie est utilisée pour la synthèse d'ATP.

J'aborde la production de ROS de ces différents complexes mitochondriaux à la page 51.



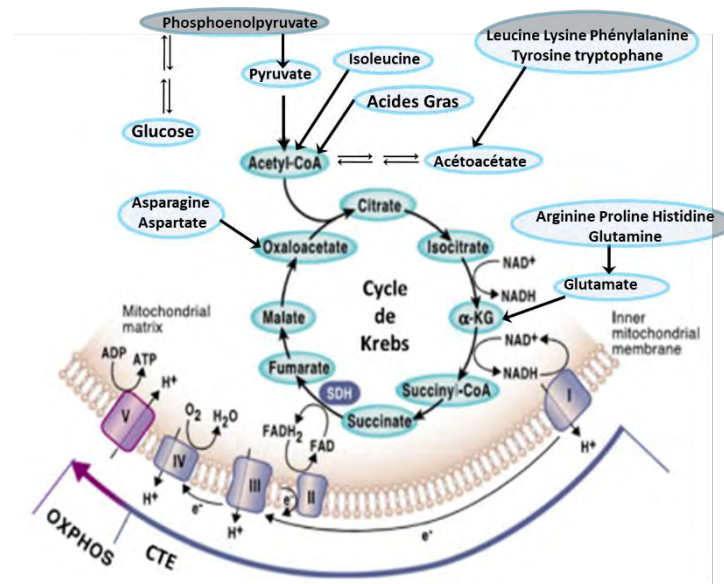
**Figure 22 : Illustration des différents complexes, qui forme la CTE et les OXPHOS.** Les intermédiaires réduits (NADH, NAD<sup>+</sup>) proviennent des différentes voies de catabolisme et alimentent les complexes I et III, afin de permettre le passage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le transfert d'électrons le long de cette chaîne de complexes utilise le coenzyme-Q (ou ubiquinone) qui véhicule les électrons du C. I et C. II vers le C. III, alors que le cytochrome c les transfère du C. III vers le C. IV. Le complexe III permet lui aussi le passage de protons dans l'espace intermembranaire. Le complexe IV (cytochrome c oxydase) permet de synthétiser de l'eau à partir d'O<sub>2</sub>, de protons présents dans la matrice, et des électrons qui circulent dans la bicouche lipidique. Le NADH permet le transport de 10 protons vers l'espace intermembranaire, tandis que le FADH<sub>2</sub> permet le transport de 6 électrons. Ceux-ci repasseront vers la matrice mitochondriale via une pompe à proton, l'ATP-Synthase qui permet *in fine* la synthèse d'ATP. Illustration issue du site internet KEGG Pathway ([https://www.genome.jp/dbget-bin/www\\_bget?pathway:map00195](https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway:map00195)).

## 1.1. Le cycle de Krebs

Ce cycle a été identifié séquentiellement entre 1930 et 1937 grâce aux recherches combinées du Dr. Albert Szent-Györgyi et du Dr. Hans Adolf Krebs. Il s'agit d'un cycle amphibolique, c'est à dire qu'il est impliqué à la fois dans des processus anaboliques et cataboliques, comme la glycolyse, la gluconéogenèse, la transamination, la désamination, la  $\beta$ -oxydation et lipogenèse (Ryan et O'Neill 2017). Il se déroule dans la matrice mitochondriale. Il implique diverses enzymes nommées, citrate synthase (CS), aconitase (ACO), isocitrate déshydrogénase (IDH),  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase (OGDH), succinyl-CoA synthase, succinate déshydrogénase (SDH), fumarase (FH) et la malate déshydrogénase (MDH). Les 3 produits majeurs du CK sont le NADH, le GTP et le FADH<sub>2</sub> (généré par le SDH aussi appelé C.II). Le FADH<sub>2</sub> et le NADH sont extrêmement importants car ils sont les intermédiaires réduits, oxydés lors de la translocation du proton par la CTE (Ryan et O'Neill 2017). Le cycle de Krebs commence par la combinaison d'un 2C-Actetyl-CoA à un 4C-Oxaloacetate (OAA) afin de générer un 6C-Citrate (**Voir figure 21**).

Ensuite le citrate est converti en son isomère ; le C6-iso citrate. Le cycle continue avec 2 réactions de décarboxylation qui donnent successivement le 5C-ketoglurate (aKG) puis le 4C-Succinyl-CoA. Ces réactions libèrent deux CO<sub>2</sub> et 2 NADH. Le 4C-Succinyl-CoA est converti en 4C-succinate. Le Succinate est oxydé pour donner du 4C-Fumarate, et 2 atomes d'hydrogène sont transférés au FAD, pour donner du 2 FADH. Cette réaction se fait par la SDH (Succinate déshydrogénase) (Martínez-Reyes et Chandel 2020).

Il est évident que les macrophages et les DCs utilisent les OXPHOS et le CK pour générer de l'ATP, cependant, lors de la polarisation M1 (en réponse au LPS) il est aussi connu qu'il se met en place un remaniement profond du CK. Celui-ci passe par l'accumulation de citrate, succinate en fumarate, et ces métabolites ont leurs importances, je vous l'explique un peu plus loin à la page 49 (Ryan et O'Neill 2017) (Martínez-Reyes et Chandel 2020).



**Figure 23 : Le CK (un hub métabolique) connecté à la CTE dans la matrice de la mitochondrie.** Le CK génère des composés réduits comme le NADH et FADH<sub>2</sub>, qui sont nécessaires à la CTE. Il génère le NADH et le FADH<sub>2</sub> à partir des différentes sources de carbohydrates (acides aminés, glucides, acides gras). Les électrons circulent au travers des complexes dans la membrane interne des mitochondries. L'oxygène est l'accepteur final des électrons, ce qui donne de l'eau. Les complexes génèrent un potentiel de membrane par accumulation de protons (H<sup>+</sup>) dans l'espace intermembranaire, ce qui permet la production d'ATP. Les complexes I et II utilisent le NADH et le FADH<sub>2</sub> respectivement, ce qui permet de faire fonctionner le CK. La succinate déshydrogénase (SDH) aussi appelé C.II est la seule enzyme de la CTE qui fait aussi partie des enzymes du CK. Illustration adaptée de Singer et collègues (Chicago -USA) (Singer et Chandel 2019).

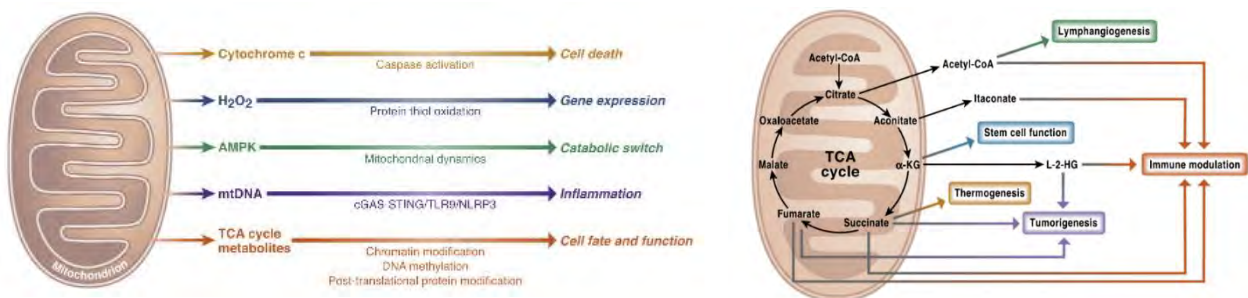
### III. Le rôle de la mitochondrie dans l'immunologie

La mitochondrie génère l'ATP à partir de diverses sources de carbone, qu'il soit sous la forme de glucose, d'acides gras, ou d'acide animés (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017). L'utilisation de ces différentes sources de carbone ou de ces différentes voies métaboliques confère à la cellule un statut énergétique ainsi qu'une biodisponibilité en métabolites et intermédiaires réduits. Cet état métabolique et énergétique est au centre d'intenses recherches. Depuis le début des années 2010, il est devenu évident que les voies métaboliques influencent directement la physiologie de la cellule immunitaire (Gaber, Strehl, et Buttgerit 2017). Le champ de recherche qui consiste à étudier les liens entre le métabolisme et l'immunité est le domaine de l'immunométabolisme. Il s'agit d'un domaine en pleine expansion où d'intenses recherches sont menées à travers le monde. La mitochondrie est une organelle qui a longtemps été réduite à un rôle d'usine de production d'ATP, mais, depuis une dizaine d'années, il est clair que son rôle est perçu comme plus complexe et même central pour un large panel de fonctions cellulaires, qui peuvent même conditionner le devenir de la cellule (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017).

### D. L'immunométabolisme des macrophages

Il a longtemps été admis que la mitochondrie recevait ses « ordres » biologiques du noyau. Ainsi l'expression génique d'origine nucléaire induit la biogenèse mitochondriale, et active les OXPHOS, ceci selon une régulation dite antérograde. Cependant, il est clair à présent que le noyau et la mitochondrie entretiennent une régulation bidirectionnelle. De façon rétrograde, la mitochondrie peut influencer l'expression génique et facilite diverses fonctions biologiques (Martínez-Reyes et Chandel 2020). De nouvelles évidences ont identifié les intermédiaires métaboliques du CK comme étant des messagers entraînant des modifications de la dynamique chromatinienne, et épigénétiques, *via* des méthylations et acétylations (Ryan et O'Neill 2017) (Martínez-Reyes et Chandel 2020).

Ces liens entre métabolisme et l'immunité peuvent se regrouper sous le terme **d'immunométabolisme** (Pearce et Pearce 2013). La mitochondrie est un carrefour central pour la signalétique cellulaire, **Figure 24 ci-dessous**.



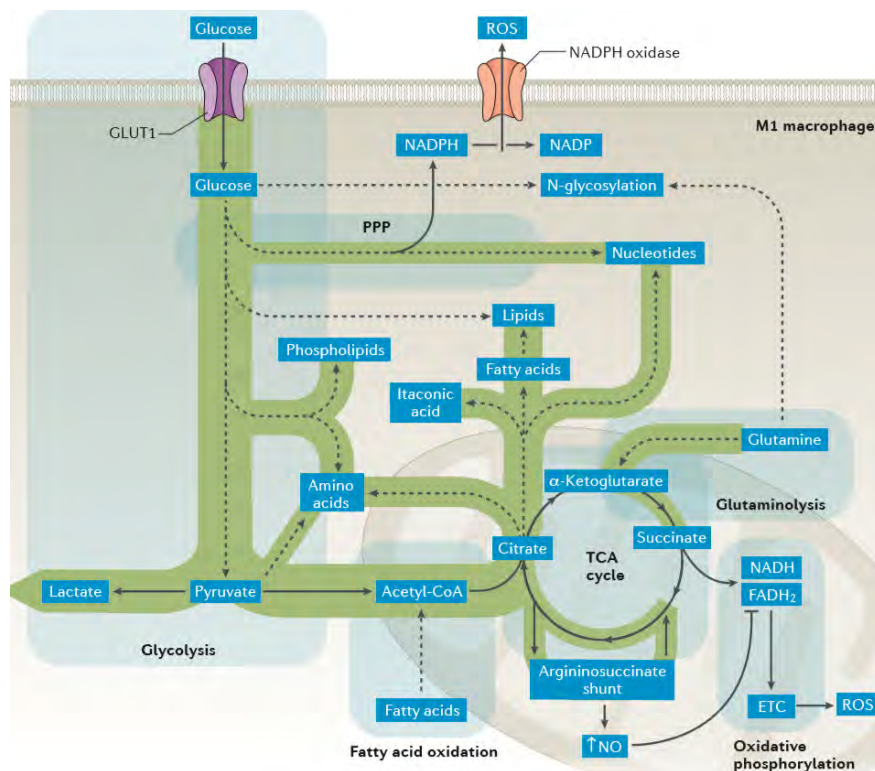
**Figure 24: (Gauche) Les signaux dépendants de la mitochondrie :** Le chondriome capte les signaux perçus depuis l'environnement et communique avec le reste de la cellule, afin de maintenir l'homéostasie. La libération du cytochrome c, active les caspases qui vont entraîner la mort de la cellule. La libération de ROSm permet d'influencer sur l'expression génique de la cellule, et active les voies de la MAPK. La libération de l'ADNm dans le cytosol active l'inflammasome via le système de détection d'ADN cytosolique cGAS-STING. Le rôle de signalisation des métabolites du CK se fait d'une part en régulant les marques épigénétiques et d'autre part en modifiant de façon post-transcriptionnelle les ARNm. **Figure 24 (Droite) : les signaux dépendant du CK :** Les intermédiaires métaboliques ont plusieurs rôles, indépendants du métabolisme, notamment dans la signalisation cellulaire. Des métabolites comme l'Acétyl-CoA, itaconate, le succinate, le fumarate et le L-2-DG peuvent altérer à la fois les réponses de l'immunité innée ou acquise. D'autres fonctions comme la lymphangiogenèse ou le maintien de l'état dit souche de cellule, ont été associés à l'Acétyl-CoA et à l'aKG respectivement. Le succinate, le L-2HG et le fumarate sont des oncométabolites qui favorisent la tumorigénèse. Hors de la cellule, le succinate peut aussi réguler la thermogénèse sans frison lors d'une exposition au froid. Les 2 illustrations sont issues de la même revue réalisée par Martinez-Reyes et collègues (Chicago-USA) (Martínez-Reyes et Chandel 2020).



Moduler le métabolisme mitochondrial pour diminuer la réaction inflammatoire est une théorie logique. Elle a été vérifiée et confirmée à diverses reprises sur divers modèles inflammatoires (Kelly et al. 2015); (Soberanes et al. 2019). Le traitement à la metformine (inhibiteur du C.I) entraîne une diminution de la survenue des maladies inflammatoires, en diminuant la polarisation M1 des macrophages (Soberanes et al. 2019). Preuve que la modulation de la physiologie mitochondriale a des répercussions systémiques. Au-delà de son rôle anti-inflammatoire (*via* la régulation de la polarisation des M1), la metformine est surtout connue comme étant le traitement de première intention du diabète de type 2. Son effet anti-diabétique passe aussi par son rôle d'inhibiteur mitochondrial (Owen, Doran, et Halestrap 2000). En effet, la metformine inhibe la CTE dans les hépatocytes ce qui diminue leur gluconéogenèse. Ceci conduit à l'augmentation de l'utilisation du glucose plasmatique, et permet une baisse de la glycémie (Owen, Doran, et Halestrap 2000). Ensemble, tout ceci illustre le rôle central du métabolisme mitochondrial dans la réponse cellulaire. Chez un macrophage, celle-ci se manifeste par sa polarisation.

## I. Le métabolisme au cours de la polarisation M1

Le métabolisme des macrophages M1 est capable d'initier la réponse inflammatoire et l'élimination des pathogènes en réalisant une glycolyse aérobie, une synthèse d'AG (médiateurs inflammatoires) (Batista-Gonzalez et al. 2020), avec une inhibition des OXPHOS (Van den Bossche et al. 2016), par un CK « brisé » qui entraîne l'accumulation de métabolites (Ryan et O'Neill 2017)(Martínez-Reyes et Chandel 2020). (Voir figure 25). Afin de satisfaire ses besoins lors de la défense contre l'agression, le macrophage réorganise son métabolisme (Gaber, Strehl, et Buttgerit 2017) (Figure 24 ci-dessous).



**Figure 25 : Schéma de l'adaptation métabolique dans le macrophage M1.** L'activation classique du macrophage utilise la glycolyse aérobie (effet Warburg) pour produire de l'énergie et augmenter le flux au travers la voie des pentoses phosphate (PPP - pentose phosphate pathway) ce qui augmente le NADPH (pour la production de ROS par la NADPH oxydase). Les ROS peuvent aussi venir de la mitochondrie, qui est elle-même alimentée par la glycolyse au travers d'apports en pyruvate puis Acétyl-CoA, ou bien par le succinyl-CoA issue de la FAO. Chez les M1, le CK est brisé. La glutaminolyse permet de produire du succinate. La première rupture du CK induit une accumulation de citrate, un substrat pour la synthèse d'itaconate et d'AG. La seconde rupture induit une accumulation de succinate, ce qui active HIF1 $\alpha$ , et ses gènes réponses afin d'augmenter la glycolyse. Pour finir le shunt argininosuccinate restaure les taux de fumarate et malate, ce qui est en faveur d'une synthèse de NO, qui va à son tour inhiber l'activité du CII (succinate déshydrogénase). Illustration issue de la revue de Gaber et collègues (Berlin-Allemagne) (Gaber, Strehl, et Buttgerit 2017).

## 1. Le catabolisme du glucose dans le M1

### 1.1. La glycolyse et l'effet Warburg au cours de la polarisation vers le M1

#### Les effets Warburg

La glycolyse catabolise le glucose et produit du pyruvate. Simultanément à cela, la glycolyse conduit à une production d'énergie sous la forme de 2 molécules d'ATP par molécule de glucose clivé. Elle se déroule dans le cytoplasme de la cellule. Le pyruvate peut entrer dans le CK, ou bien être métabolisé par fermentation, pour produire du lactate ou de l'éthanol. L'augmentation des flux glycolytiques augmente la production de pyruvate et induit une sur-production de lactate.

En 1924, Otto Warburg rapporte que les cellules tumorales utilisent davantage la glycolyse que les OXPHOS pour produire l'énergie ce qui lui valut l'obtention du prix Nobel en médecine en 1931. Initialement découvert sur des cellules tumorales, cet effet est également retrouvé au sein des cellules saines en normoxie, comme les macrophages au cours de leur polarisation M1 (Palsson-McDermott et O'Neill 2013). En effet, les macrophages ont un grand besoin énergétique pour leur mobilité, leur survie, la synthèse de cytokines, mais aussi pour la défense rapide face aux pathogènes (L. Yang et al. 2014; Semba et al. 2016) (Palsson-McDermott et O'Neill 2013). Après la reconnaissance du LPS via TLR4, les macrophages surexprimant GLUT1 et la PKM2, favorisant l'entrée et le catabolisme du glucose (Palsson-McDermott et al. 2015) (Palsson-McDermott et O'Neill 2013). Les cellules de l'immunité, comme les neutrophiles, présentent un faible nombre de mitochondries ce qui les prédisposent à utiliser préférentiellement la glycolyse plutôt que les OXPHOS. Ils ont une durée de vie relativement courte et sont très dépendants du glucose pour survivre. Une fois activés, *via* l'effet Warburg et la voie des pentoses phosphates (PPP), ils génèrent une grande quantité de NADPH, essentiel pour le fonctionnement de la NADPH-oxydase (Pearce et Pearce 2013).

#### Les cibles pharmacologiques et leurs effets sur la glycolyse

Cibler les enzymes de la voie de la glycolyse pour modifier les flux métaboliques est une théorie plutôt bien documentée. Parmi les enzymes impliquées dans cette voie on retrouve l'hexokinase, première enzyme de la glycolyse, elle transforme le glucose en glucose-6-phosphate en hydrolysant un ATP en ADP. Un inhibiteur bien connu est le 2-Deoxy-D-glucose (2DG). Il s'agit d'un sucre qui présente deux groupements hydroxyles qui vont bloquer la voie de la glycolyse, et empêcher la production de glucose-6-phosphate. Une inhibition de la glycolyse avec du 2DG inhibe la production d'IL1 $\beta$ , dans des macrophages *in vitro* sur des RAW 264.7 (lignée de macrophages) et sur des macrophages péritonéaux au cours d'un traitement au LPS (100 ng/ml pendant 24 heures) (L. Yang et al. 2014). L'inhibition de la glycolyse est associée à une amélioration des OXPHOS, afin de subvenir aux besoins de la cellule (L. Yang et al. 2014). Le traitement au 2DG rend les M1 comparables à des macrophages naïfs (M0) ceci en diminuant la libération d'IL-1 $\beta$  et d'HMGB1 (L. Yang et al. 2014).

### **Rôle de la PKM 1/2**

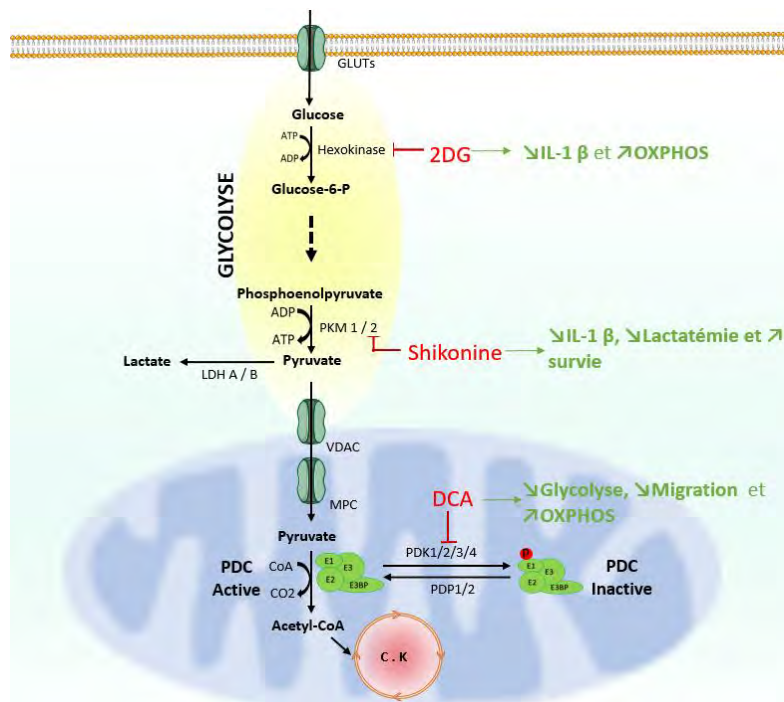
Il est aussi possible de bloquer la glycolyse en bloquant la dernière enzyme de la voie, la PKM 1 / 2. Elle est l'enzyme limitante de cette voie, et elle convertit du Phosphoenolpyruvate en Pyruvate. Un traitement avec de la Shikonine (utilisée dans la médecine chinoise comme traitement anti-inflammatoire) améliore la survie des animaux après un CLP, et diminue la libération d'IL-1 $\beta$  par les macrophages péritonéaux (L. Yang et al. 2014). Cette même équipe, dirigée par Daolin Tang, a publié en 2018 une autre étude qui montre le rôle de PKM2 dans la sensibilité aux chocs septiques chez la souris (Deng et al. 2018). Leur modèle de souris KO (présentant une déficience d'un inhibiteur de PKM2 (Bmal1) spécifiquement dans les macrophages) présente une létalité plus importante pour les chocs septiques (type CLP) avec une augmentation sévère des taux de lactates plasmatiques, preuve d'une intense activité glycolytique (Deng et al. 2018). Ils expliquent la sensibilité des animaux par cette surproduction de lactate, qui induit l'activation du FdR STAT1 (Retrouvé induit par la polarisation M1 (Murray et al. 2014)), qui va diminuer l'activité des lymphocytes T modulateurs, qui diminuent l'inflammation (Deng et al. 2018). Il a aussi été montré par d'autres équipes, notamment celle de Luke O'Neill en 2015, que la PKM2 participe à la stabilisation d'HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) et à la synthèse d'IL-1 $\beta$  (Palsson-McDermott et al. 2015). De par ce rôle dans la stabilisation d'HIF1 $\alpha$ , PKM2 (dimérique) lie la glycolyse à la polarisation vers le M1 (Palsson-McDermott et al. 2015). L'axe d'activation de HIF1 $\alpha$  par la PKM2 induit aussi la libération d'HMGB1 acétylé de façon post-traductionnelle (L. Yang et al. 2014).

L'activité de la glycolyse est directement liée au profil inflammatoire des macrophages, qui influencent grandement la survie des animaux lors de sepsis. Une autre façon d'inhiber la glycolyse est de jouer sur les PDKs (qui comprennent les PDK1, PDK2, PDK3 et PDK4).

### **Rôle de la PDK 1/4**

Ce sont des kinases inhibitrices qui phosphorylent le complexe de la pyruvate déshydrogénase. Par leur action inhibitrice, elles empêchent la conversion du pyruvate en Acétyl-CoA utilisé par le CK (Semba et al. 2016). Il est montré que la délétion de PDK2 ou de la PDK4, ou des deux enzymes en même temps empêche la progression vers le profil M1, induisant une amélioration des OXPHOS avec un CK fonctionnel (B.-K. Min et al. 2019).

La PDK1 est liée à la polarisation et à la production de cytokines inflammatoires (B.-K. Min et al. 2019). Les M1 utilisent la glycolyse pour entraîner leur réponse inflammatoire. Les macrophages PDK1 $^{-/-}$  en M1 présentent une diminution de la glycolyse et de la réponse inflammatoire (Tan et al. 2015a). A l'inverse, les M2 PDK1 $^{-/-}$  présentent des OXPHOS améliorés (Tan et al. 2015a). Ensemble, cela montre que PDK1, régule l'oxydation du glucose et contribue à l'acquisition du phénotype des macrophages. Son KO dans les macrophages diminue le profil inflammatoire et favorise le phénotype M2 (Tan et al. 2015a). Ce phénotype s'explique par une levée de l'inhibition exercée sur l'entrée d'Acétyl-CoA (issue du pyruvate) dans le CK ce qui augmente le substrat des OXPHOS. Ceci, dans le macrophage, se traduit par une polarisation vers le M2 (Tan et al. 2015a). L'utilisation d'un inhibiteur des PDKs, comme le DCA (dichloroacetic acid) entraîne une diminution de la migration des macrophages *in vitro* et *in vivo* (Semba et al. 2016). De plus, un prétraitement avec du DCA améliore la survie des animaux lors d'endotoxémie suite à une injection de LPS (40 mg/kg) (Semba et al. 2016). L'utilisation de DCA diminue l'expression en ARNm d'IL-1 $\beta$  dans les macrophages (Semba et al. 2016).



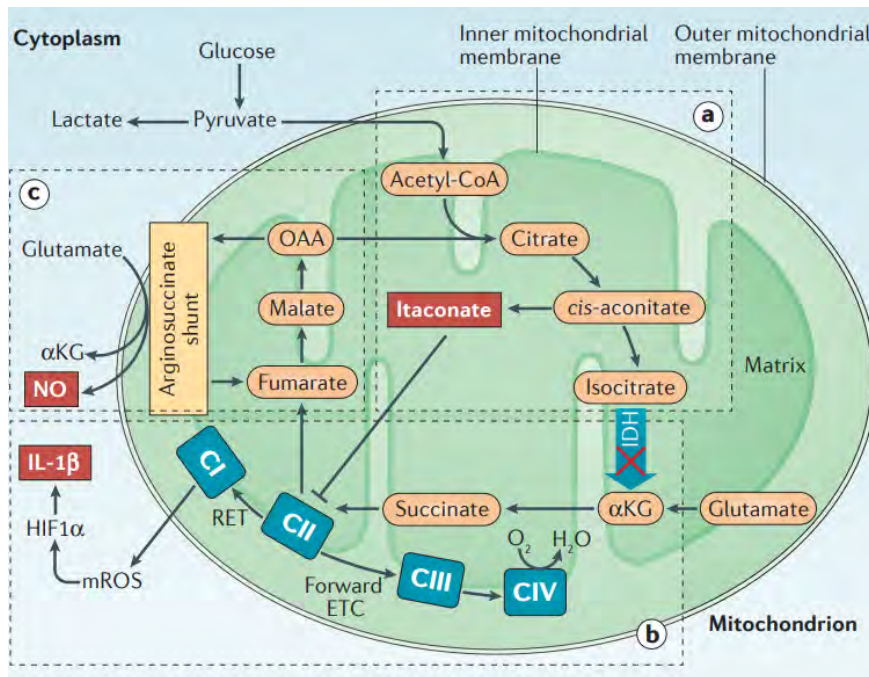
**Figure 26 : La glycolyse, l'entrée du Cycle de Krebs, leurs inhibiteurs et conséquences biologiques.** La glycolyse du glucose et l'entrée des deux molécules de pyruvate produites dans le CK sont au centre de plusieurs études en immunométabolisme. L'utilisation de 2DG sur des RAW 264.7 macrophages après traitement au LPS (100 ng/ml) modifie le métabolisme du glucose et leur profil inflammatoire. On observe une diminution de l'expression d'IL-1 $\beta$  et la respiration mitochondriale du M1 est restaurée (L. Yang et al. 2014). L'utilisation de shikonine inhibe spécifiquement la PKM2, entraîne une diminution de l'expression de l'IL-1 $\beta$  et une augmentation de la lactatémie et de la survie lors de sepsis (L. Yang et al. 2014). L'utilisation de DCA (dichloroacetic acid) entraîne une diminution de la glycolyse et une augmentation de la respiration mitochondriale (OXPHOS) (Palsson-McDermott et O'Neill 2013). L'utilisation du DCA est aussi montrée comme diminuant la migration des macrophages *in vivo* via une inhibition de la glycolyse (Semba et al. 2016). Illustration bilan sur les inhibiteurs pharmacologiques issue des publications de (Hunan-Chine) (L. Yang et al. 2014); (Dublin- Ireland) (Palsson-McDermott et O'Neill 2013); (Tokyo-Japon) (Semba et al. 2016).

Ces agents pharmacologiques montrent l'importance de la glycolyse dans la polarisation M1 des macrophages, et l'incidence de cette dernière sur l'activité mitochondriale, l'inflammation systémique, et la survie des animaux.

## 2. Le CK et ses métabolites lors de la polarisation M1

Dans les macrophages, le CK est sujet à diverses altérations lors de la polarisation vers le M1. Lorsque le macrophage devient inflammatoire, il y a une rupture dans le CK. Les M1 présentent un cycle de Krebs brisé par l'inactivation de deux enzymes qui aboutissent donc à trois séquences enzymatiques distinctes (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017) (**Voir figure 27 ci-dessous**) Ce qui se traduit par l'accumulation de succinate et de citrate, qui à leur tour vont influencer la réaction inflammatoire (E. L. Mills et O'Neill 2016); (Gaber, Strehl, et Buttgerit 2017).

Le succinate est connu pour avoir des effets pro-inflammatoires en augmentant la production de ROSm qui stabilisent HIF1 $\alpha$  et libère de l'IL1 $\beta$  dans les macrophages murins (Tannahill et al. 2013). De récentes recherches ont montré que les M1 reprogramment leur métabolisme pour produire des ROS pour lutter contre l'infection (E. L. Mills et O'Neill 2016); (Ryan et O'Neill 2017). La réorganisation du CK au cours de la polarisation du macrophage M1 peut être représentée de façon suivante :



**Figure 27 : Le métabolisme des M1 présente un Cycle de Krebs “brisé” pour initier et amplifier l’inflammation.** Les macrophages M1 sont des cellules hautement glycolytiques et caractérisées par une forte production de lactate. Ils exhibent aussi un CK brisé à deux endroits distincts, qui aboutissent à trois conséquences distinctes. Les deux ruptures dans le CK sont au niveau de l’enzyme (IDH) et du complexe II. **a)** Le défaut d’activité de l’IDH entraîne une accumulation des métabolites en amont de cette réaction enzymatique : comme le **cis-aconitate**. Les M1 surexpriment Irg1 et produisent une grande quantité d’Itaconate à partir du cis-aconitate. **b)** habituellement le C.II (SDH) reçoit les électrons du succinate et les passe au C.III dans le sens classique de la CTE. Cependant les M1 présentent un transfert des électrons réverse (RET ; Reverse Electron Transfer) au travers de la CTE, donc un transfert du complexe II au complexe I, ce qui induit la production de ROSm par le C.I. Les ROSm ainsi produit vont stabiliser HIF1 $\alpha$  et induire la production d’IL1 $\beta$ . L’itaconate entraîne une inhibition partielle du C.II, ce qui diminue le RET et donc la production de ROSm. Du fait de l’inhibition de l’IDH, la synthèse de l’ $\alpha$ KG doit être réalisée par la dégradation de la glutamine, en glutamate lors de la glutaminolyse. **c)** Le shunt arginosuccinate et la dernière partie du CK forment un nouveau cycle qui a comme effet net la synthèse de NO à partir de glutamate. Illustration issue de Mehta et collègues (Chicago-USA) (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017)

**La première interruption** du CK se fait par un défaut d’activité de l’enzyme IDH (3 isoformes : 1, 2 et 3) qui transforme l’isocitrate en  $\alpha$ -KG, ce qui induit une accumulation de citrate et de cis-aconitate. Les M1 surexpriment Irg1 (Acod1) qui converti le cis-aconitate en **itaconate** par décarboxylation. **L’itaconate** a des propriétés antimicrobiennes et son accumulation participe à la deuxième rupture de l’activité enzymatique. L’itaconate est un inhibiteur faible et endogène du complexe II (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017)

**La seconde interruption** du CK se fait au niveau du C.II et entraîne un transport rétrograde des électrons (RET) du C.II vers ce C.I ce qui conduit à la production de ROSm. Ce mécanisme est possible par la glutaminolyse qui permet la production de l’ $\alpha$ KG s’accumulent sous la forme de succinate. Le succinate favorise l’activation et la stabilisation de HIF1 $\alpha$  via la production de ROSm (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017). La glutaminolyse se déroule dans la mitochondrie et est responsable de la production d’énergie à partir de la dégradation de la glutamine. Ceci nécessite la conversion de la glutamine en glutamate par la GLS (Glutaminase) suivi de la deamination du glutamate, réalisée par la GDH (glutamine déshydrogénase) pour former de l’ $\alpha$ KG, qui va permettre la production d’ATP dans le CK (Dumont et al. 2020).

**La troisième séquence** permet la production nette de NO à partir de glutamate, lors de la mise en place du le shunt arginosuccinate et la dernière partie du CK (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017); (Jha et al. 2015).

## 2.1. Les métabolites du CK au sein du macrophage M1

Il est clair à présent que des modifications du CK auront des conséquences sur la biodisponibilité des métabolites, influençant à leur tour l'immunométabolisme. Loin d'être inertes, ces métabolites ont de multiples rôles :

### Le citrate et l'Acétyl-CoA

Il est essentiel au fonctionnement du CK. Sa production est possible dans différents compartiments cellulaires, à partir de diverses sources de carbone. Il est synthétisé par la mitochondrie mais aussi dans le cytosol, par export du citrate mitochondrial via le transporteur SLC25A1. Le citrate cytosolique est alors pris en charge par l'ATP citrate lyase ACLY qui le convertit en Acétyl-CoA (Martínez-Reyes et Chandel 2020). L'ACLY peut être cytosolique ou nucléaire. Dans le noyau, les Histones-Acétyl-Transférases (HAT) transfèrent le groupement Acétyl de l'Acétyl-CoA aux queues en N-Ter des histones. L'acétylation des histones influence la dynamique chromatinienne et régule de façon épigénétique l'expression génique. Les HAT sont sensibles à la disponibilité de l'Acétyl-CoA cytosolique qui est directement dépendant du statut métabolique de la cellule (Martínez-Reyes et Chandel 2020). Les macrophages, lors de leur activation, présentent une augmentation des taux d'Acétyl-CoA. Les macrophages en présence de LPS sur expriment ACLY et présentent davantage d'acétylation d'histone (Viola et al. 2019). L'acétyl-CoA fait donc le relais entre des modifications mitochondriales et l'épigénétique lors de la polarisation du M1 (Martínez-Reyes et Chandel 2020). Il est connu que des peptides comme NFκB, l'IL-6, et l'IL-10 peuvent être acétylables, ce qui ajoute un niveau de régulation post-traductionnel à ces protéines de l'inflammation (Viola et al. 2019).

Suite à la détection de LPS, une première réponse inflammatoire intervient durant les deux premières heures. Les ARNm d'IL-1β et Cx11 augmentent à 30 minutes jusqu'à un pic à 2 heures post-stimulation au LPS. Ces gènes sur-exprimés présentent alors au niveau de leur euchromatine la marque H3K4me3 (méthylation ouverte) (Lauterbach et al. 2019). En effet, il peut aussi entraîner des Malonylations (modifications post traductionnelles, retrouvées sur des histones et sur certaines protéines impliquées dans la synthèse des lipides) et participer à la lipogenèse qui permettra de soutenir (i) l'expansion de la membrane plasmique pour permettre une meilleure présentation des peptides via les CMH.II, et (ii) la production de cytokines inflammatoires, et le PGE2 (prostaglandin E2) qui est un puissant médiateur inflammatoire (N. C. Williams et O'Neill 2018); (Batista-Gonzalez et al. 2020).

### L'α céto-glutarate

L'αKG module la réponse hypoxique vis-à-vis d'HIF1α. En normoxie, les résidus des prolines portés sur le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène d'HIF1α sont hydroxylés par les PHDs (prolyl-hydroxylases 1-3). L'hydroxylation d'HIF1α signe son adressage au protéasome. En hypoxie ou avec de faibles taux d'αKG ou encore en cas de production de ROSm, les PHDs ne hydroxylent plus HIF1α, ce qui entraîne son accumulation et sa translocation dans le noyau (Martínez-Reyes et Chandel 2020). Une fois dans le noyau il peut entraîner notamment l'expression d'IL-1β (Tannahill et al. 2013).

En accord avec ceci, le fait de traiter des BMDM avec de l'αKG, augmente l'activité des PHDs et inhibe l'activité d'HIF1α, ce qui diminue drastiquement l'expression de l'ARNm d'IL-1β (Tannahill et al. 2013). Donc l'αKG est plutôt retrouvé dans les macrophages de type M2 et agit en faveur d'une réponse de type anti-inflammatoire. En présence d'IL-4 il y a une augmentation de la glutaminolyse qui permet de générer de manière abondante de l'αKG alors que dans les M1, on constate de faibles taux d'αKG (Martínez-Reyes et Chandel 2020). L'αKG supprime l'activation IKKβ, nécessaire pour la réponse inflammatoire du facteur NFκB, par l'intermédiaire d'activité de PHDs (P.-S. Liu et al. 2017)

Les auteurs ont aussi montré que l' $\alpha$ KG produit par la glutaminolyse améliore la survie des animaux au cours d'endotoxémie (P.-S. Liu et al. 2017). La glutaminolyse permet la production l' $\alpha$ KG permet l'activation du phénotype M2 (activation de la beta oxydation, et profil d'expression génique). L' $\alpha$ KG participe à la polarisation M2 par un remaniement épigénétique en déméthylant H3K27 sur les promoteurs des gènes marqueurs du phénotype M2 (Viola et al. 2019). L' $\alpha$ KG généré par la glutaminolyse favorise l'activité des PHDs et inhibe l'activité du FdT HIF1 $\alpha$  (Viola et al. 2019).

### Le succinate

Le succinate inhibe la sécrétion d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , de NO et d'IL-1 $\beta$  (Harber et al. 2020). Le succinate est synthétisé dans la matrice mitochondriale, il est le substrat du C.II et participe à la synthèse d'ATP lors de son oxydation en fumarate. Chez les macrophages M1 il y a une diminution de l'activité du SDH (C.II) ce qui entraîne une accumulation du succinate. Cette accumulation de succinate permet de stabiliser HIF1 $\alpha$  et permet la synthèse d'IL-1 $\beta$  (Tannahill et al. 2013) ; (Martínez-Reyes et Chandel 2020). Malgré une activité diminuée le C.II oxyde le succinate en fumarate par le C.II, et cette oxydation est nécessaire pour permettre la production d'IL-1 $\beta$  et de ROSm (E. L. Mills et O'Neill 2016); En effet, l'inhibition de C.II (SDH) par le NPA (3-Nitropropionic acid) protège les animaux de l'endotoxémie (Martínez-Reyes et Chandel 2020). La production d'IL-1 $\beta$  passe par la production de ROSm (ion superoxyde) du C.I par transfert des électrons du C.II vers le C.I selon la RET (E. L. Mills et O'Neill 2016). Dans la circulation, le succinate se lie à son récepteur : SUCNR1 (G protein-coupled succinate receptor 1) présent à la surface des cellules du rein, de la rate, et des cellules myéloïdes comme les DCs et les macrophages (Rubic et al. 2008); (Viola et al. 2019). Une fois lié à son récepteur, il déclenche une activation de la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase). Dans les cellules myéloïdes, ce couple ligand/récepteur est impliqué dans la réponse inflammatoire. Rubic et collaborateurs ont montré que l'accumulation de succinate dans les DCs, active SUCNR1 ce qui augmente la sécrétion des cytokines inflammatoires chez l'homme et la souris (Rubic et al. 2008).

Cependant, il a aussi été montré par plusieurs groupes, que le succinate et SUCNR1 participent à certains processus anti-inflammatoires. Wu et collaborateurs observent que le succinate libéré dans le milieu extracellulaire par les cellules tumorales, polarise les TAM en un phénotype M2 via sa liaison à SUCNR1 (Wu et al. 2020). Ceci a été confirmé par la délétion de SUCNR1 qui entraîne une polarisation M2 des macrophages de moindre amplitude (Wu et al. 2020). Toutefois, il est connu que les tumeurs libèrent plusieurs facteurs en faveur de l'angiogénèse et de l'immunosuppression (Hanahan et Weinberg 2011). Les TAM sont alors dans un contexte immuno-métabolique très différents de celui étudié par Mills et O'Neill en 2016. Sur une étude portant sur le rôle du succinate dans l'obésité, Keiranetal et collaborateurs ont montré des effets similaires, sur des souris dépourvues en SUCNR1 spécifiquement dans les cellules myéloïdes, ce qui entraîne une up-régulation des gènes des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et Il-6 (Keiran et al. 2019). Dernièrement, un double effet, pro- et anti-inflammatoire a été attribué à l'axe succinate/SUCNR1 dans les macrophages. Ceci pouvant s'expliquer par les différents sels de succinate utilisés, comme le diméthyle succinate (forme de synthèse perméable à la membrane plasmique des cellules) et le disodium succinate (non perméable à la membrane plasmique) (Harber et al. 2020).

On peut donc retenir que l'accumulation et l'oxydation du succinate par la mitochondrie est associée à l'inflammation des macrophages (E. L. Mills et O'Neill 2016). Néanmoins, le rôle d'un tel métabolite ne peut pas être si simplement associé à un phénotype uniquement inflammatoire. Sa liaison à son récepteur et sa physiologie dans les cancers sont la preuve de la complexité de son action (Keiran et al. 2019). De plus, l'utilisation de molécules de synthèse comme les sels de succinate peuvent biaiser nos conclusions sur action et effet.

## Le fumarate

Le fumarate se retrouve accumulé dans les macrophages lors de la polarisation vers le M1 suite à la rupture du CK (Ryan et O'Neill 2017). Cette accumulation est essentielle pour la réponse inflammatoire des macrophages, comme le montrent les travaux d'Arts et collègues (Arts et al. 2016). Ils ont montré que la glutaminolyse et la glycolyse sont indispensables dans les monocytes, lors de l'inflammation, et que ceci passe par une accumulation de fumarate et des remaniements épigénétiques. Les auteurs proposent que le fumarate inhibe KDM5 une histone demethylases, ce qui augmente le niveau des marques de types H3K4me3 sur le promoteur de TNF- $\alpha$  et IL-6 (Arts et al. 2016). Un traitement avec du (mono méthyl fumarate) MMF entraîne des modifications épigénétiques similaires à celles retrouvées lors d'une réaction avec le  $\beta$ -glycan des bactéries par les macrophages (Arts et al. 2016). Le MMF augmente la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 par les macrophages après une deuxième réaction face au LPS. Un autre rôle du fumarate passe par son activation via Nrf2 (erythroid-derived - like 2), connu pour polariser les macrophages vers le M2 (Kobayashi et al. 2016).

En effet, le DMF (diméthyle fumarate) est un médicament (Térfunomide) en première intention pour traiter la sclérose multiple, une maladie inflammatoire auto-immune du système nerveux central (SNC) (Parodi et al. 2015). Une fois métabolisé en mono méthyl fumarate (MMF) il traverse la BHE et exerce son rôle protecteur (Parodi et al. 2015). *In vitro* le MMF entraîne l'activation de Nrf2 sur des neurones. Sur la microglie, il favorise le switch en diminuant la réponse inflammatoire et en polarisant vers un phénotype M2 en augmentant l'activité de phagocytose (Parodi et al. 2015).

Il a aussi été montré un rôle du DMF dans les maladies inflammatoires hépatiques. Sangineto et collaborateurs ont montré que le DMF induit une diminution des cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Cxcl1), et de l'infiltration des neutrophiles (Sangineto et al., 2020). Le DMF, via hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCAR2) entraîne une inhibition de l'infiltration des neutrophiles et de la réaction inflammatoire. Ils ont validé le fait que le MMF se lie à HCAR2 et entraîne la modification de polarisation de la microglie en faveur d'un phénotype M2 (Parodi et al. 2015).

## L'itaconate

En 1995, on découvre pour la première fois le gène *Irg1* (immune responsive gène 1) et 18 ans après il a été découvert qu'il codait la protéine IRG1, qui synthétise l'itaconate dans la matrice mitochondriale dans le macrophage (Hooftman et O'Neill 2019). L'itaconate inhibe partiellement le C.II (SDH) ce qui inhibe la réponse inflammatoire (E. L. Mills et al. 2018). Ceci limite l'oxydation du succinate, ainsi que l'inflammation (Martínez-Reyes et Chandel 2020). La culture de BMDM avec du diméthyl itaconate (DI) bloque la polarisation M1 et la libération d'IL-6 et d'IL-1 $\beta$  sans pour autant diminuer la production de TNF- $\alpha$  (Lampropoulou et al. 2016). L'effet anti-inflammatoire passerait donc selon les auteurs par une inhibition du C.II plutôt que par une inhibition au niveau de NF $\kappa$ B. Ce qui a été vérifié en bloquant le C.II avec du malonate, et il a été décrit les mêmes effets sur l'inflammation, que lors de traitement des BMDM avec du DI (Lampropoulou et al. 2016). (E. L. Mills et al. 2016). L'itaconate dont la quantité est augmentée chez le M1 par rapport au M0, active Nrf2 et inhibe la production d'IL-1 $\beta$  et de ROS (E. L. Mills et al. 2018). Il est décrit que le LPS et l'IFN $\gamma$  induit une augmentation de l'expression d'Irg 1 dans les macrophages par rapport aux macrophages (E. L. Mills et al. 2018). L'itaconate, provoque une diminution de l'expression du gène codant pour l'IFN $\gamma$  (E. L. Mills et al. 2018). L'effet anti inflammatoire de l'itaconate a été confirmé chez la souris. La délétion spécifique du gène *Irg1* dans les macrophages induit une augmentation de l'expression d'IFN $\gamma$  (Y. Li et al. 2013).



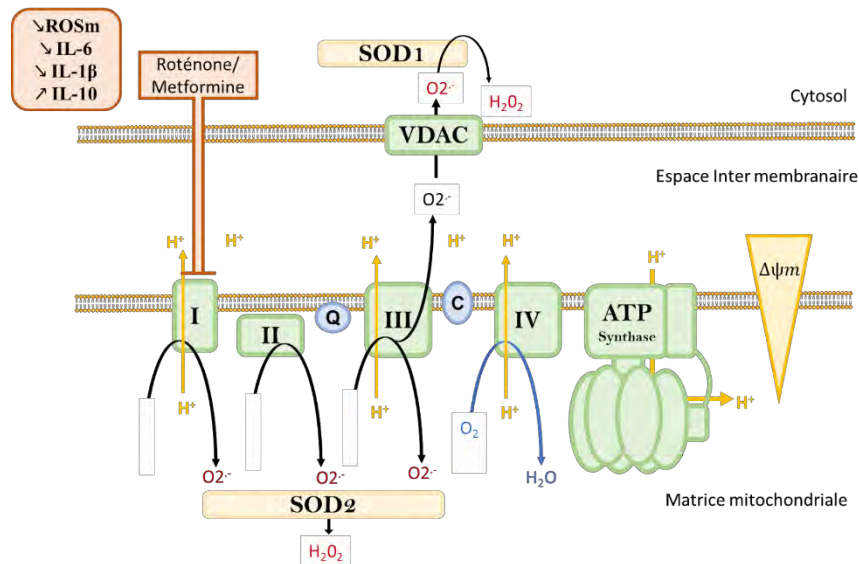
## 2.2. Les ROSm au sein des macrophages M1

### Les ROS mitochondriaux

Dans la mitochondrie, plus de 90% de l'oxygène consommé par les mammifères est réduit sous la forme d'eau par les cytochromes oxydases. Seule une faible part est convertie en ROS (Grivennikova et Vinogradov 2013). Lors de la réponse inflammatoire, les macrophages M1 réorganisent leur chondriome pour la production de ROSm (E. L. Mills et O'Neill 2016). Cette production de ROS mitochondriaux passe par l'oxydation du succinate par le C.II (E. L. Mills et O'Neill 2016).

Les complexes C.I, C.II et C.III sont les sources principales d'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) dans la mitochondrie (Diebold et Chandel 2016). Les C. I et C.II le libèrent dans la matrice mitochondriale, alors que le C.III libère l'ion  $O_2^-$  à la fois dans la matrice et dans l'espace intermembranaire. L'ion  $O_2^-$  généré par les C. I et C.II dans la matrice, est rapidement converti en  $H_2O_2$  par la SOD2 mitochondriale (superoxyde dismutase proteins 2). Alors que l'ion  $O_2^-$  libéré par le C.III dans l'espace intermembranaire diffuse au travers de canaux anionique dépendant du voltage (VDAC- voltage-dépendent anion channels) localisé sur la membrane externe de la mitochondrie, jusque dans le cytosol, où il sera converti en  $H_2O_2$  par la SOD1 cytosolique (Diebold et Chandel 2016). La production de ROS par le C.I est associée à la survenue de thrombose chez l'homme (Soberanes et al. 2019). L'inhibition du C.I par la metformine entraîne une diminution de l'expression d'IL-6, impliqué dans l'incident thrombotique (Soberanes et al. 2019) (**Voir figure 27**). De façon similaire, l'inhibition (par la roténone ou la metformine) du C.I entraîne une diminution de la production d'IL-1 $\beta$  dépendante des ROS, avec en parallèle une augmentation de la production d'IL-10 par les macrophages après un challenge par le LPS. (Kelly et al. 2015). La metformine est donc une cible thérapeutique contre l'inflammation (Kelly et al. 2015). (Soberanes et al. 2019). Cependant, la roténone augmente la production de ROSm dans le compartiment sub-mitochondrial, c'est-à-dire, au niveau de la matrice (Qun Chen et al. 2003). Malgré l'idée que le C.I génère ses ROS uniquement dans la matrice, et que celle-ci soit étanche aux ions, il a été montré, que l'utilisation de roténone induit l'apoptose via l'augmentation de la production de ROS mitochondriaux (N. Li et al. 2003). De façon contre-intuitive il a récemment été montré par l'équipe de Gokhan S. Hotamisliligil que l'absence de cardioline (qui confère l'étanchéité de la MMI) dans la MMI n'est pas associée à une augmentation des ROS mitochondriaux, dans le muscle et le cœur (Goncalves et al. s. d.). De plus, dans l'étude de Soberanes illustre que le blocage du C.I par la metformine entraîne une diminution de la production de ROS par le C.III (seul capable de libérer l'ion  $O_2^-$  (précurseur de  $H_2O_2$ ) hors de la mitochondrie) (Soberanes et al. 2019).

Dans le péritoine lors d'une infection, les macrophages utilisent le glutamate qui y est abondant (afin de réaliser la glutaminolyse) qui permet de générer des ROSm ( $\alpha$ KG et Succinate) pour éliminer l'agent pathogène (Davies et al. 2017). Pour répondre à ce besoin de ROSm, le chondriome se relocalise autour du phagolysosome (Davies et al. 2017). L'activation des TLR (1/2/4) d'un macrophage induit le recrutement des mitochondries au phagosomes ce qui augmente la production de ROS issue du métabolisme mitochondrial (oxydation succinate) et participe à l'élimination du pathogène (West et al. 2011). Elles se regroupent autour du phagosome pour une élimination optimale du pathogène via leur production de ROS (Geng et al. 2015).



**Figure 28 : Schéma de la production de ROSm des M1 :** Les C.I, C.II et C.III sont producteurs de ROSm. L'utilisation de metformine inhibe le C.I et diminue l'état inflammatoire des macrophages, ce qui diminue la survenue de thrombose. Illustration synthèse de Saul Soberanes (Chicago-USA) (Soberanes et al. 2019). de Beth Kelly (Dublin - Irlande) inflammatoires (Kelly et al. 2015) ; Lauren Diebold (Chicago-USA) (Diebold et Chandel 2016).

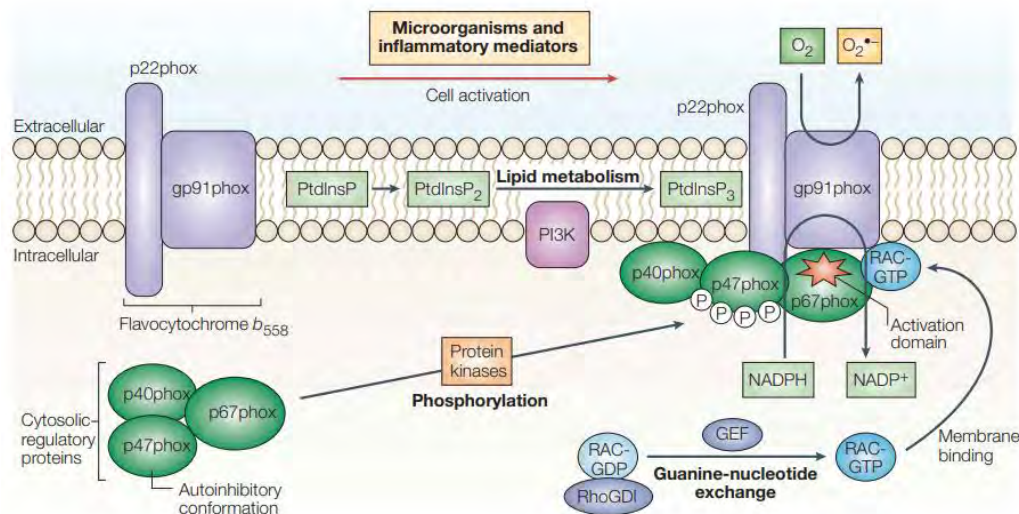
Lors d'une infection, les macrophages produisent une grande quantité de ROS à visée microbicide. Mais le macrophage doit mettre en place des systèmes de défense contre ce stress oxydant. Il a été découvert par les travaux de Wang et collaborateur que les kinases Mst1/2 (pour mammalian Ste20-like kinase 1) régulent la défense oxydante (P. Wang et al. 2019) d'une part via la détection des ROS produit (Mst1/2-Keap1-NRF2) et d'autre part en contrôlant l'adressage des mitochondries autour du phagosome (Geng et al. 2015). En effet, les animaux dépourvus en Mst1/2 dans les cellules myéloïdes (Vav1-Cre et LysM-Cre) sont plus sensibles aux sepsis (Geng et al. 2015). Ce phénotype à l'échelle de l'animal est associé, au niveau cellulaire, à la mort des macrophages dû à l'absence des défenses anti-oxydantes (Kong et al. 2010) ;(Geng et al. 2015). Le mécanisme de défense contre le stress oxydant, mis en place par les macrophages, est le suivant: Sur le site de production de ROS (la membrane du phagosome, ou de la mitochondrie) les kinases Mst1/2 phosphorylent Keap1 (kelch like ECH associated protein 1) ce qui inhibe l'ubiquitination et dégradation du FdT Nrf2, ce qui protège la cellule (P. Wang et al. 2019). Pour prouver que la mortalité des macrophages et des animaux Mst1/2-/- est dû à un défaut de Nrf2. Il est démontré que l'absence combinée de Nrf2 et de la sous unité catalytique de la NADPH-oxydase (gp91) réduit fortement l'inflammation, et prolonge significativement la survie des animaux Nrf2 KO lors du sepsis (Kong et al. 2010). Enfin, l'absence de Mst1 chez l'Homme et la souris entraîne une immunodéficiência caractérisée par des infections récurrentes et une neutropénie (P. Wang et al. 2019). Ainsi, les défenses antioxydantes des phagocytes jouent un rôle central dans leur survie et le bon déroulé de la réaction inflammatoire lors d'une infection.

### Les ROS membranaires (NADPH-Oxydase)

La génération de ROS des phagocytes se fait aussi via la machinerie de la **NADPH-oxydase**. La découverte de la famille des homologues de gp91 phox a fait émerger le concept que les ROS peuvent être intentionnellement générés (Lambeth 2004). La NADPH oxydase produit de façon régulière des ROS, suite à divers stimuli comme des facteurs de croissance, des cytokines ou du calcium (Lambeth 2004). Ce complexe protéique est le seul exemple de génération intentionnelle de ROS dans la cellule de mammifère, principalement retrouvé dans les neutrophiles et macrophages (Lambeth 2004). La sous-unité catalytique, gp91phox (aussi appelé NOX2) est associée à d'autres sous-unités régulatrice p22phox, p47phox, p40phox, p67phox pour former la NADPH oxydase (Lambeth 2004). La mutation

de gp91 et p47 dans les leucocytes pulmonaires, bloque la réalisation du burst oxydatif, ce qui sensibilise grandement les animaux à des infections pulmonaires (Ramond et al. 2019). La production de ROS peut se faire par le don d'électrons du NADPH, à l'oxygène pour générer l'ion superoxyde (Lambeth 2004) (**Voir figure 29**). Chez des animaux dépourvus en gp91 et p47 (incapable de réaliser le burst oxydatif) un sepsis avec *Escherichia coli* est réalisé et les animaux KO présentent un infiltrat immun dans les poumons bien plus important que chez le WT, ceci associé à une sévère diminution de la capacité de clairance du pathogène par rapport au WT (Gao et al. 2002). Dans cette étude, les auteurs confirment le rôle bactéricide joué par la NADPH oxydase (Gao et al. 2002).

Mais les ROSm sont aussi des molécules dangereuses si leur concentration n'est pas finement régulée (altération de la réplication de l'ADN, réduit la taille des télomères, diminue les OXPHOS) (P. Wang et al. 2019). (Diebold et Chandel 2016). Il existe divers systèmes antioxydants : la redoxine, ou la glutathione, elles utilisent l'oxydation du NADPH pour transformer le H<sub>2</sub>O en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La glutathione (composée d'acides aminés : cystéine, acide glutamique et glycine, qui agissent comme antioxydant) peut activer Nrf2 et HO-1 (hème oxygenase-1) qui permettent une meilleure défense face aux stress oxydants (Kwon et al. 2019).



**Figure 29 : La Génération de ROS par la NADPH-Oxydase** : l'activation de la gp91phox survient lors du recrutement des protéines régulatrices (p40, p47, et p67) à la membrane plasmique, sur le flavocytochrome b. Cette structure recrute alors des kinases (PKC et Akt) qui phosphorylent p47. Sur la membrane plasmique la PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) produit du 3-phosphorylated phosphatidylinositols (PtdInsP), permettant de stabiliser le complexe protéique. Finalement l'activation de RAG-GTP, permet son adressage au complexe qui devient actif. La NADPH oxydase ainsi structurée va oxyder le NADPH et transférer son électron à une molécule d'O<sub>2</sub> pour générer l'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Illustration issue de J.David Lambeth en 2004 (Atlanta-USA) (Lambeth 2004).

### 3. Le rôle du calcium au sein du macrophage M1

Dans la mitochondrie, le calcium est identifié comme pouvant influencer la production d'ATP. Hans Adolf Krebs a démontré que trois enzymes du CK ont une efficacité augmentée en présence de calcium : la PDH (Pyruvate DésHydrogénase), la OGDH (2-OxoGlutarate DesHydrogenase) et la ICDH (Isocitrate DesHydrogenase) (Griffiths et Rutter 2009). Une entrée de calcium mitochondrial va donc soutenir la CTE et augmenter la production d'ATP en augmentant les taux de NADH (Griffiths et Rutter 2009) ; (Rizzuto et al. 2012). Dans des macrophages humains, l'entrée de calcium dans la mitochondrie est associée à un phénotype de type M2, avec une OXPHOS fonctionnelle. A l'inverse, l'inhibition de l'entrée de calcium diminue drastiquement la capacité de phagocytose, par une modification du statut énergétique (Tedesco et al. 2019). L'accumulation de calcium dans la matrice se fait via le MCU (Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport) alors que l'efflux est médié par l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore) (Rizzuto et al. 2012). Une fuite de calcium via l'ouverture du PTP, entraîne une diminution de la production d'ATP, une diminution du potentiel de membrane, la libération du

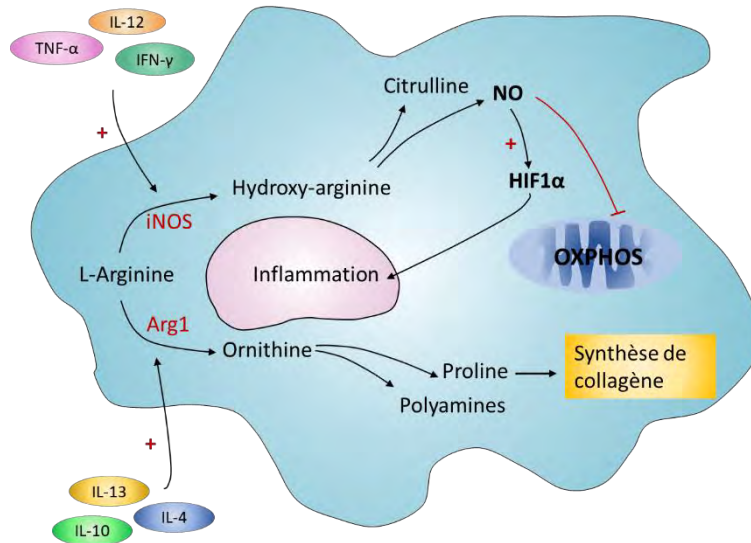
cytochrome c, qui sera reconnue dans le cytoplasme par le protéasome, qui entrainera l'apoptose de la cellule (Rizzuto et al. 2012).

Il a été montré que la concentration calcique intracellulaire de macrophages péritonéaux de rats, suite à une injection de LPS augmente, ce qui active les PKCs et NFkB, favorisant la synthèse de NO et de TNF- $\alpha$  (X. Zhou, Yang, et Li 2006). Les échanges de calcium sont souvent associés avec le transfert d'autres ions comme le potassium (K<sup>+</sup>) et le chlore (Cl<sup>-</sup>). Le transporteur TWIK2 (*Kcnk6*) permet l'efflux de potassium dans les macrophages lors d'un sepsis, ce qui permet l'activation de l'inflammasome. Le KO de TWIK2 dans le macrophage présente une inhibition de l'inflammasome lors du sepsis par rapport au WT (Di et al. 2018).

#### 4. Le rôle du NO au sein du macrophage M1

Les macrophages en culture, après 24 heures de polarisation M1, présentent des OXPHOS très diminuées (Van den Bossche et al. 2016). Cette diminution peut s'expliquer par la production concomitante de NO qui a lieu dans les macrophages M1 (Van den Bossche et al. 2016). L'IFN $\gamma$  et le LPS induisent l'expression de l'iNOS (inducible nitric oxide synthase) dans les cellules myéloïdes lors d'une infection, celle-ci en synthétise en concentration supra physiologique (jusqu'à 1000 fois plus) (Sharma, Al-Omran, et Parvathy 2007). Le NO participe à la polarisation vers le M1 induit par le LPS. Inhiber l'iNOS lors d'une polarisation M1 (LPS) restaure les OXPHOS. Ici, Jean Van Den Bossche a montré que le NO inhibe les OXPHOS des mitochondries, ce qui verrouille les macrophages dans un phénotype M1. Ce résultat est confirmé chez les macrophages iNOS<sup>-/-</sup>, où l'on observe lors de la polarisation M1 aucune modification du métabolisme (pas de diminution des OXPHOS, et pas d'augmentation de la glycolyse) (Kelly et O'Neill 2015). Les auteurs montrent que le NO produit par l'iNOS exprimée par les macrophages lors d'une polarisation M1, provoque la diminution des OXPHOS (nitrosylations) et favorise l'augmentation de la glycolyse (Sharma, Al-Omran, et Parvathy 2007) ; (Kelly et O'Neill 2015) ; (Van den Bossche et al. 2016).

L'utilisation d'un inhibiteur de la iNOS (le 1400W) permet en présence d'IL-4 de switcher le phénotype M1 vers un phénotype M2. Ce switch est impossible pour le macrophage en présence de NO malgré la présence d'IL-4. Le NO (nitric oxide) est une RNS (reactive nitrogen species) qui peut inhiber les OXPHOS (en nitrosylation les protéines du C.I, C.II, C.IV et des cytochromes c oxydase), mais aussi inhiber la polarisation M1 (en nitrosylation IRF5) (Kelly et O'Neill 2015) ; (Pearce et Pearce 2013). Enfin lors de la phagocytose d'un pathogène les RNS sont aussi bactéricides, en altèrent la réplication et le métabolisme du pathogène (Bogdan 2015; Batista-Gonzalez et al. 2020). L'Arginine est le substrat de l'iNOS pour produire du NO (Kelly et O'Neill 2015). Les M2, eux expriment faiblement l'iNOS, mais ont une forte expression d'Arg1, qui favorise la synthèse d'ornithine, qui initie la voie des polyamines, qui signent un catabolisme de l'arginine de type M2 (Bossche et al. 2012). Ainsi l'arginine, en fonction de l'enzyme qui la dégrade (iNOS ou Arg1) peut déterminer le phénotype du macrophage soit inflammatoire soit anti-inflammatoire.



**Figure 30 : Le métabolisme de l'arginine dans le macrophage M1 vs M2 :** Chez la souris l'IFN- $\gamma$ , IL-12, et le TNF- $\alpha$  stimulent la synthèse de NO dans les macrophages. Il est un des signaux clés qui induit l'activation M1 et la réponse inflammatoire. Le NO entraîne une inhibition des OXPHOS dans la mitochondrie des M1, ce qui soutient l'inflammation et verrouille le macrophage M1 dans un état inflammatoire. A l'inverse, les cytokines comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 entraînent une polarisation M2, ce qui est associé à une activation de l'Arginase 1. La production d'ornithine permet la synthèse de polyamines et de proline. Elles sont impliquées dans l'inhibition de l'inflammation et la synthèse des fibres de collagène (lors de la cicatrisation) respectivement. Illustration issue de la publication de Matthias Hesse en 2001 (Freiburg, Allemagne) (Hesse et al. 2001) ; de Jan Van Den Bossche (Amsterdam – Pays-Bas) (Bossche et al. 2012) (Van den Bossche et al. 2016) ; Carole Peyssonnaux (San Diego – USA) (Peyssonnaux et al. 2005).

## II. Le métabolisme lors de la polarisation M2

Les M2 présentent une oxydation des acides gras et des OXPHOS fonctionnelles. Initialement on pensait que la glycolyse était une marque des M1 et que la FAO était une marque des M2. Maintenant on sait que la FAO participe dans la polarisation M1 (14, 15) et que la glycolyse intervient dans la polarisation M2 (Batista-Gonzalez et al. 2020). Dans les macrophages M2, l'arginase 1 est induite. Elle transforme l'arginine en ornithine, qui sert à la synthèse de polyamines précurseur de la synthèse du collagène pour la régénération (Bossche et al. 2012); (Batista-Gonzalez et al. 2020). Les principales cytokines responsables de la polarisation vers le M2 sont IL-4, IL-10 et l'IL-13. Elles sont synthétisées par les Lt-Th2 et les macrophages M2 eux-mêmes (Martinez et Gordon 2014). Elles sont reconnues par leurs récepteurs qui entraînent la translocation dans le noyau de STAT3 et STAT6 responsables de la polarisation vers le M2. L'IL-4 ou l'IL-13 ont un effet synergique avec la phagocytose des corps apoptotiques pour orienter le macrophage vers le M2 (Bosurgi et al. 2017). En plus des interleukines, d'autres molécules peuvent aussi influencer la réponse inflammatoire. Les glucocorticoïdes (GC) ont été montrés comme répresseurs de la réponse inflammatoire, voir même favorables à la polarisation de type M2 (Ehrchen et al. 2007). L'IL-4 induit la polarisation M2, au travers de l'axe akt/mTORC1 et régule Acly (une enzyme clé dans l'acétylation des histones et l'induction de la réponse M2 dans le noyau) (Covarrubias et al. 2016). Cette publication illustre le rôle de Akt/mTORC1 dans la polarisation du M2. Cet axe augmente l'utilisation du glucose lors de la polarisation (Covarrubias et al. 2016).

## 1. Rôle des glucocorticoïdes

A 20°C (température standard d'hébergement des animaux) les animaux sont soumis à un stress thermique, associé à la sécrétion de GC (40 ng/ml de corticostérone dans le sang) (Giles et al. 2017). A l'inverse, à 30°C (température de thermoneutralité (qui permet à un animal de ne fournir aucune énergie pour maintenir sa température interne à sa valeur de référence)) il a été dosé deux fois moins de GC (20 ng/ml) dans le sang des animaux (Giles et al. 2017). La diminution de moitié des taux de corticostérone explique l'augmentation des taux de cytokines inflammatoires. Bhattacharyya et ses collègues, dans l'équipe de Louis Muglia a montré que la délétion du récepteur au glucocorticoïde (RG) dans les macrophages entraîne une mortalité très importante des animaux face à un sepsis (Bhattacharyya et al. 2007). Ce qui montre le rôle modulateur des GC vis-à-vis de l'inflammation. Les animaux mutants pour le RG exhibent des taux de TNF- $\alpha$  et IL-6 systémiques trois fois et deux fois plus importants par rapport aux animaux contrôles, respectivement.

D'autre part, l'inhibition des GC (à thermoneutralité) et de leur frein sur le SI chez les animaux (sans aucune modification du régime alimentaire) entraîne une inflammation, une résistance à l'insuline et de l'athérosclérose (Giles et al. 2017) ; (X. Y. Tian et al. 2016). GC entraîne une activation de la protéine GILZ (Glucocorticoid (GC)-induced leucine zipper) qui a des effets anti-inflammatoires. GILZ est exprimé chez les BMDM naïf, et son expression est augmentée chez les M2 (Vago et al. 2020). En M1 les BMDM sans GILZ présentent un phénotype M1 exacerbé (IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, STAT1) par rapport au WT (Vago et al. 2020). In vivo, après une inflammation au LPS il est retrouvé davantage de macrophages M1 dans le péritoine des animaux GILZ  $-/-$ , associés à une éférocytose défectueuse. Ainsi le récepteur aux GC est un acteur important dans la reprogrammation des macrophages et dans l'efférocytose (Vago et al. 2020).

Il est possible *in vivo* d'inhiber la polarisation du M2 en bloquant la respiration mitochondriale ou l'import d'AG dans la mitochondrie via CPT1 $\alpha$ , que ce soit par de l'utilisation d'oligomycine ou d'etomoxir, respectivement (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017); (Nomura et al. 2016). La fonctionnalité de la mitochondrie est essentielle pour la polarisation M2. Lors d'une polarisation vers le phénotype M2, la respiration mitochondriale est augmentée 4 heures après la polarisation. Durant cette période les mitochondries oxydent préférentiellement les dérivés du glucose, plutôt que ceux des acides gras. La FAO n'est pas nécessaire dans les étapes précoces du macrophage M2, alors que l'oxydation du glucose est requise pour la polarisation vers le M2 (Tan et al. 2015b).

## 2. Rôle du tryptophane et de la Kynurénine

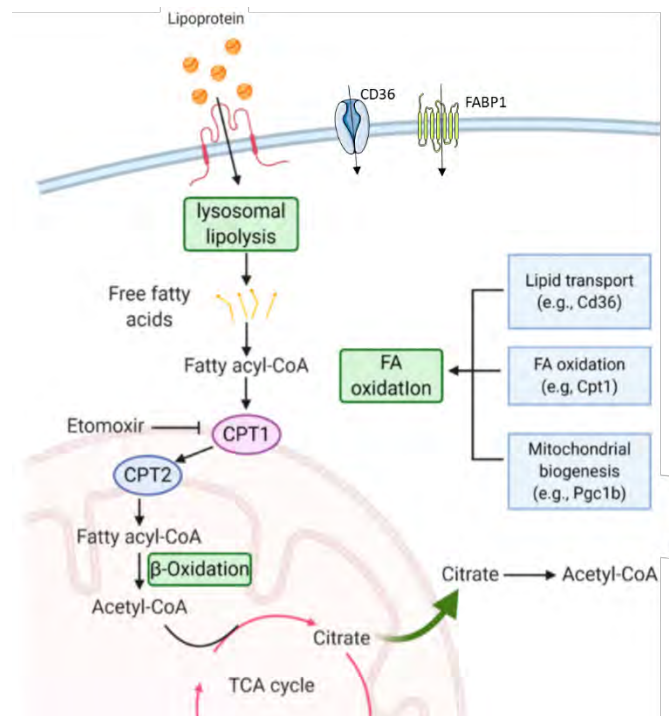
La voie de la Kynurénine est la voie principale de catabolisme du tryptophane (Baumgartner, Forteza, et Ketelhuth 2019). L'IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) est l'enzyme limitante de cette voie, hautement régulée par les cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et l'INF $\gamma$  (Baumgartner, Forteza, et Ketelhuth 2019). La voie de la Kynurénine est une des voies de synthèse de NAD $^{+}$ , qui favoriserait le switch des macrophages vers le phénotype M2 (Minhas et al. 2019; S. Zhang et al. 2019). La voie de la kynurénine est retrouvée dans l'inflammation (aiguë ou chronique) comme l'athérosclérose (Baumgartner, Forteza, et Ketelhuth 2019). Face au LPS, les macrophages modifient leur métabolisme et diminuent leur synthèse de novo de NAD $^{+}$  (essentielle pour la phagocytose et la respiration cellulaire) (Castro-Portuguez et Sutphin 2020). Les taux de NAD $^{+}$  régulent donc la polarisation, la phagocytose et les sécrétions des macrophages. Le LPS diminue la synthèse de NAD $^{+}$  par diminution de la voie de la Kynurénine dans les macrophages dérivés des monocytes humains. Si on restaure la voie de la Kynurénine en présence de LPS on restaure la respiration mitochondriale (Minhas et al. 2019).

### 3. Le catabolisme des lipides dans le M2

Le catabolisme des lipides dans les macrophages a lieu principalement dans deux contextes. Le premier, lors de la polarisation en macrophages M2, le deuxième lorsque le macrophage est face à de grandes quantités de lipides (Voir Figure 31). Ces cas pathologiques sont représentés notamment au cours de l'obésité et de l'athérosclérose.

La polarisation des M2 est caractérisée par l'augmentation de leur OXPHOS, alimentée par une FAO active. Cette FAO est associée à une diminution de la glycolyse et de la voie des PPP. La glutaminolyse sert aussi pour alimenter la CTE (Gaber, Strehl, et Buttgerit 2017). Les M2 exhibent une Arginase 1 active, qui participe à la synthèse du collagène, ainsi qu'une biogénèse mitochondriale augmentée (Gaber, Strehl, et Buttgerit 2017). Considérés ensemble, et à l'inverse des M1 (longévité relativement courte des M1) les M2 (par leur OXPHOS actives et leur phénotype anti-inflammatoire) présentent une longévité plus importante (Gaber, Strehl, et Buttgerit 2017).

L'obésité induit une inflammation indépendante d'agressions extérieures qui a causé 4 millions de morts et 120 millions de malades en 2015 (GBD 2015 Obesity Collaborators et al. 2017). L'inflammation est la cause de l'insulinorésistance associée à l'obésité chez la souris (Wei et al. 2016). Les ATM phagocytent les adipocytes nécrotiques des souris obèses. Ils ont davantage de lysosomes avec un métabolisme lipidique actif alors qu'ils produisent des cytokines inflammatoires (Kratz et al. 2014); (Fitzgibbons et Czech 2016). L'élimination d'un adipocyte se fait alors par la formation d'un compartiment lysosomal extracellulaire, composé de plusieurs macrophages, qui entourent l'adipocyte (Zheng et al. 2016); (Haka et al. 2016). Durant l'élimination des adipocytes les macrophages sont exposés à divers AG qui polarisent les macrophages de façon inédite et définis par l'équipe de Lev Becker à Chicago, comme des MMe pour (Metabolic Macrophages) (Kratz et al. 2014); (Fitzgibbons et Czech 2016); (Coats et al. 2017).



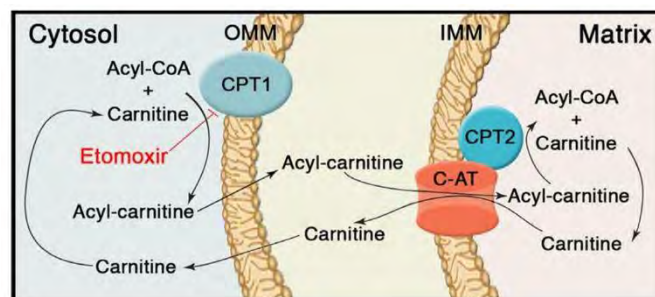
**Figure 31 : Le catabolisme lipidique des macrophages M2.** Une polarisation M2 (induite par l'IL-4) ou le FdT PPAR- $\gamma$  favorisent l'expression des gènes relatifs aux transporteurs des AG (e.g., CD36), à l'induction de la FAO (e.g., Cpt1 $\alpha$ ) ou à la biogénèse mitochondriale (e.g., PGC1 $\beta$ ). Ensemble ils induisent l'oxydation des AG par les macrophages. L'internalisation des lipides des lipoprotéines (et des ACs) alimente la FAO ( $\beta$ -oxydation). Illustration issue de la revue de Jiawei Yan et de Tiffany Horng (Shanghai, Chine) (Yan et Horng 2020) et adaptée avec la revue de Adélie Dumont (Nice - France) (Dumont et al. 2020).

### 3.1. L'entrée des lipides dans le macrophage

Les AG ne peuvent entrer dans la cellule que sous leur forme libre (Dumont et al. 2020). Une fois libérés les AG (à longues chaînes) peuvent traverser la membrane plasmique grâce au transporteur CD36 ou par les FATPs (fatty acid transport proteins) comme FATP1 ((SLC27A1) (Yvan-Charvet et Ivanov, s. d.). Le FdT, PPAR- $\gamma$  est exprimé dans les macrophages qui accumulent les lipides, il est directement impliqué dans l'activation et la transcription du gène codant pour CD36 dans les macrophages (Chawla et al. 2001). L'implication de PPAR- $\gamma$  dans l'assimilation des AG par les macrophages, soutient l'hypothèse selon laquelle la FAO dans les macrophages est retrouvée chez les M2.

Une fois dans la cellule l'AG est d'abord couplé avec un Acyl-CoA par l'ACS (Acyl-CoA synthetase). Les Acyl-CoA ainsi synthétisés ne peuvent pas diffuser au travers de la membrane de la mitochondrie, ils doivent donc être activement transportés pour y être métabolisés (Dumont et al. 2020). Le transporteur mitochondriale CPT1 (carnitine palmitoyl transférase 1) transporte l'Acyl-CoA dans l'IMS, il est alors pris en charge par CPT2 (carnitine palmitoyl transférase 2) qui le transporte jusque dans la matrice mitochondriale (Dumont et al. 2020). La FAO nécessite la transformation de l'Acyl-CoA en Acétyl-CoA par l'ACADs (Acetyl-CoA dehydrogenase) puis son oxydation dans la matrice mitochondriale par le CK (Dumont et al. 2020). Les M2 ou les MMe acquièrent tous les deux des gouttelettes lipidiques. Dans ces deux populations de macrophages les lipides vont être dégradés. Soit par l'action d'une lipase lysosomale ; la LIPA (lipase acide du lysosome) soit par l'axe CD36 / ATGL (Adipose TriGlyceride Lipase) une lipase cytoplasmique afin d'approvisionner la CTE en Acétyl-CoA issue de la FAO, ce qui va augmenter les OXPHOS (S. C.-C. Huang et al. 2014).

La LIPA, lors de l'efférocytose (action retrouvée chez les M2 et les MMe) contribue à son bon déroulement. Inhiber la LIPA induit chez l'animal, une augmentation des signaux inflammatoires (activation de l'inflammasome), une accumulation de dépôts adipeux et la formation pathologique de « foam cells » (Viaud et al. 2019). La LIPA prévient donc l'inflammation et permet une efférocytose efficace. De façon intéressante la réexpression de la LIPA spécifiquement dans les cellules myéloïdes, corrige la plupart du phénotype chez la souris LIPA-/- (Viaud et al. 2019). Ce qui suggère que la LIPA et le catabolisme des lipides dépendant des lysosomes, dans les macrophages, prévient des maladies métaboliques (Viaud et al. 2019). Les lysosomes des macrophages servent à plusieurs fonctions dont la digestion et la présentation d'antigènes mais aussi à la résorption osseuse (Blott et Griffiths 2002) et à la phagocytose, efférocytose (S. Zhang et al. 2019) et mitochondrie (Osellame et Duchon 2013), ainsi qu'au trafic du cholestérol (Safitig et Klumperman 2009).



**Figure 32 : Le transport des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie.** Illustration du rôle de CPT1 (sur la membrane externe de la mitochondrie) et de CPT2 (sur la membrane interne de la mitochondrie) lors du transport des AGs sous la forme d'AcylCoA dans la matrice. L'etomoxir agit comme un inhibiteur de CPT1. Illustration issue de la publication de Mitsunori Nomura (Maryland-USA) (Nomura et al. 2016).



## Les lipides : substrats essentiels du M2

Les taux d'Acétyl-CoA sont aussi importants pour permettre le remodelage chromatinien nécessaire pour l'acquisition du phénotype M2 (M. M. Mehta, Weinberg, et Chandel 2017); (Vats et al. 2006);(S. C.-C. Huang et al. 2014; Remmerie et Scott 2018). La FAO dans les M2, produit une grande quantité d'énergie. L'oxydation d'une molécule de palmitate (AG à 16 carbones) entraîne la production de 7 FADH<sub>2</sub>, 7 NADH et 8 molécules d'Acetyl-CoA, ce qui génère par les OXPHOS une production nette de 129 molécules d'ATP (Dumont et al. 2020). De quoi satisfaire aux besoins de la cellule sans production de ROS.

L'absence de CoA peut limiter la polarisation M2 (dépendante de l'IL-4), en déplaçant les CoA impliqués dans les modifications épigénétiques. La séquestration des CoA lors d'un excès d'etomoxir peut limiter l'accessibilité en Acétyl CoA, qui régule la réponse de l'IL-4 au niveau des acétylations des histones (Covarrubias et al. 2016).

### 3.2. Controverse autour du rôle des AG dans la polarisation M2

Cette controverse implique les publications basées sur l'utilisation de l'etomoxir (S. C.-C. Huang et al. 2014) et celles utilisant le modèle génétique Toren Finkel et (Nomura et al. 2016).

Les macrophages CPT2<sup>-/-</sup> ne semblent pas être freinés dans leur polarisation en M2 *in-vitro* (Nomura et al. 2016). En effet, ils expriment à l'identique du WT les marqueurs M2 : CD301 et CD206. Ceux-ci indépendamment de l'inhibition de l'augmentation des OXPHOS, propre de la FAO (inhibée dans les macrophages CPT2<sup>-/-</sup>) (Nomura et al. 2016). Cependant, Nomura et les auteurs n'ont pas regardé la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires et se sont limités à la caractérisation de cinq marqueurs (CD301, CD206, Retnla, Mlg2 et Arg1).

De plus Nomura décrit une perte similaire d'Arg 1, Mgl2 et Retnla (induit par l'IL-4) en présence d'etomoxir que ce soit chez les CPT2<sup>+/+</sup> ou les CPT2<sup>-/-</sup>, ce qui souligne un possible effet non spécifique de l'inhibiteur de CPT1 : etomoxir, sur la polarisation M2 (Nomura et al. 2016). Les interprétations faites à partir des études réalisées avec l'etomoxir présentent des effets confondants dû à l'etomoxir (Divakaruni et al. 2018). Vats et collègues retrouvent la même diminution du phénotype M2 en bloquant pharmacologiquement la FAO (etomoxir) qui est décrite par Nomura et collaborateurs (Vats et al. 2006). Ensemble, ils montrent que le rôle de la FAO dans la polarisation M2 est plus complexe que prévu (Nomura et al. 2016);(Van den Bossche et al. 2016).

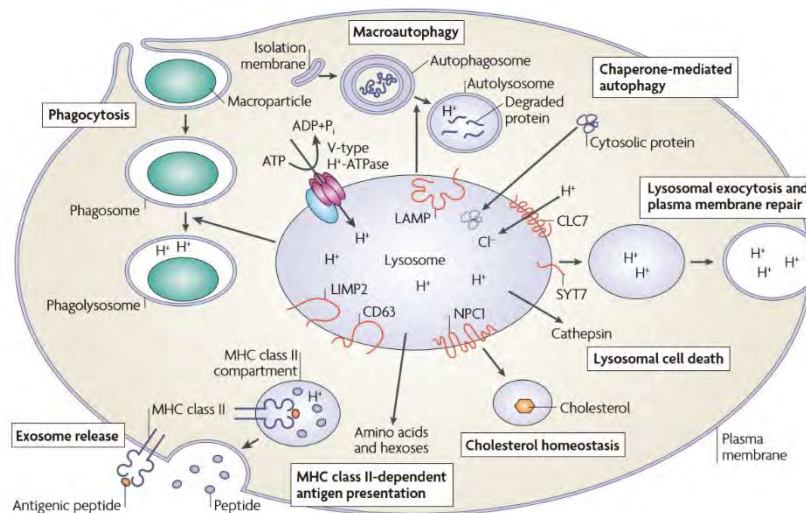
De plus, Vats et collaborateur montrent que le métabolisme oxydatif et la biogénèse de la mitochondrie, régulé par PGC1 $\beta$  et STAT6 sont essentiels pour la polarisation vers le M2 associé à une L'oxydation des AG, la biogénèse mitochondriale, et l'efférocytose, semblent être les « jalons » de la polarisation M2. De plus amples recherches sont encore à réaliser pour élucider le rôle de la FAO dans la polarisation du M2.

Ajoutez à la complexité de la polarisation M2, il existe des différences inter espèces sur l'effet de la polarisation des macrophages et leur besoin en FAO. Namgaladze et Brüne publient en 2016 la preuve que contrairement aux macrophages murins, les macrophages humains ne sont pas dépendants de l'augmentation de la FAO pour acquérir le phénotype M2 (Namgaladze et Brüne 2014). Ceci souligne encore une fois l'importance des précautions lors de la transposition à l'Homme, des découvertes faites chez la souris.

## E. La fonction biologique des lysosomes dans l'immunité et le métabolisme

La phagocytose est importante chez le M1 mais encore plus chez le M2.

Quelques généralités : Une cellule possède entre 50 à 1000 lysosomes. Deux classes de protéines sont essentielles pour la fonction du lysosome : les hydrolases et les protéines lysosomales, membranaires (LMP). On note plus d'une 50<sup>ème</sup> d'hydrolases lysosomales et les LMP les plus abondantes sont LAMP1 et LAMP2 (Saftig et Klumperman 2009) (Voir figure 33)



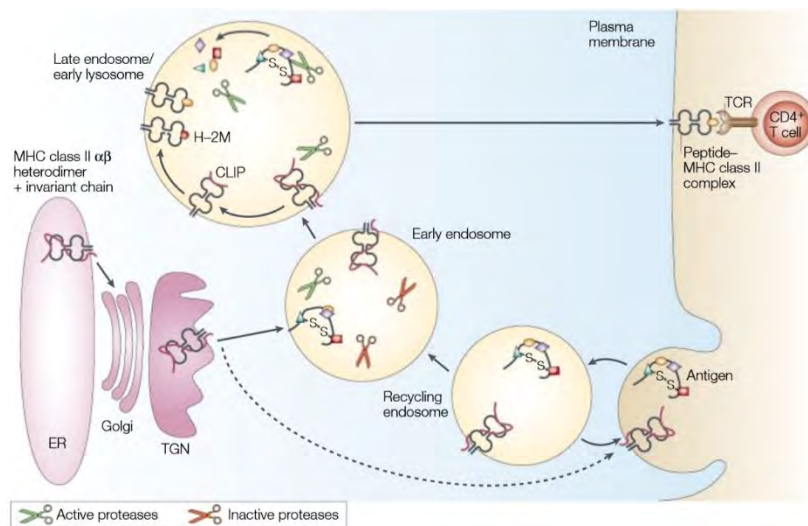
**Figure 33: Les fonctions des protéines membranaires du lysosome** : le lysosome est central, il a un pH acide, et participe à la dégradation des macromolécules par ses hydrolases acides. Le lysosome est crucial pour la maturation du phagosome en phagolysosome, lors du processus de phagocytose. La macro autophagie permet l'élimination d'organelles et ce phénomène est nécessaire pour la mort cellulaire ou la prolifération. La phagocytose est dépendante de la fusion des lysosomes à l'autophagosome pour donner l'autolysosome, dans lequel la dégradation a lieu. L'exocytose des lysosomes et la réparation de la membrane plasmique sont des événements de fusion dépendants du Ca<sup>2+</sup> et de la synaptotagmine 7. Le lysosome peut entraîner une apoptose, qui implique la libération de la cathepsine initialement présente dans sa lumière, au travers d'un mécanisme inconnu pour le moment. L'homéostasie du cholestérol est contrôlée par l'efflux du cholestérol lysosomal, au travers de NPC1. La présentation d'antigène au CMH-II requiert les protéines et protéines de membrane du lysosome. Issue de Saftig et Klumperman (Kiel - Allemagne) (Saftig et Klumperman 2009).

Le lysosome, et le phagosome, présentent des profils différents entre les macrophages M1 et M2, chez l'Homme, *in vitro* (Canton et al. 2014). En effet, il existe une forte différence entre le pH du M1 (avoisinant une valeur de pH 7.5) et celui du M2 (avoisinant une valeur de pH 5) dans le phagosome. Cette différence de pH est associée à une production de ROS plus importante à l'intérieur du phagosome (par la NADPH oxydase) chez le M1, par rapport au M2 (Canton et al. 2014). De plus, la NADPH oxydase est retrouvée à la membrane du phagosome chez le M1 alors que chez le M2, elle quitte rapidement la membrane. Le défaut d'acidification du phagosome chez le M1, passe en partie par la présence et l'activité de la NADPH-oxydase. Lorsqu'elle est inhibée, il est décrit une acidification plus efficace du compartiment, chez les M1 (Canton et al. 2014). La NADPH oxydase « alcalinise » la lumière du phagosome lorsqu'elle réalise la réaction de dismutase, afin de produire l'ion superoxyde (Canton et al. 2014).

## I. Les maladies liées aux lysosomes

Récemment, le lysosome passe de la position d'un organite statique (l'élimination des déchets cellulaires), à celle d'un organite très dynamique, qui participe aux adaptations métaboliques et environnementales de la cellule (Ballabio et Bonifacino 2019). Son rôle dans les maladies humaines, passe d'implication rare comme dans les maladies du stockage lysosomal, ((LSDs) pour Lysosomal Storage Disorders) à des implications dans les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, Huntington ou Charcot) aux maladies métaboliques, jusqu'aux cancers (Ballabio et Bonifacino 2019); (Puertollano et al. 2018). Les LSD (maladies monogéniques) sont dues à une mutation qui inactive une des protéines lysosomales impliquée (ou pas) dans la fonction de dégradation de ce dernier. La maladie de Pompe est due à un défaut en  $\alpha$ -glucosidase lipase acide, une enzyme présente dans la lumière du lysosome. Chez l'homme, l'absence complète de cette enzyme entraîne une cardiomyopathie infantile, ainsi qu'une myopathie squelettique, qui sera fatale lors des deux premières années de vie (Fukuda et al. 2006). Dans cette maladie, la mutation aboutit à l'accumulation progressive de glycogène non dégradés dans le compartiment lysosomal (Hers 1963; Lieberman et al., s. d.). Un autre cas de LSD est la Mucopolipidose de type IV, causée par la mutation du transporteur TRPML 1 (Mcon11) (TRPML 1 libère le  $\text{Ca}^{2+}$  du lysosome vers le cytosol) qui aboutit à l'accumulation de cholestérol dans le lysosome (Ballabio et Bonifacino 2019); (Saftig et Klumperman 2009). Enfin, un défaut de dégradation du lysosome est impliquée dans la survenue de maladies bien plus graves et fréquentes, comme celles neurodégénératives (Nixon 2013).

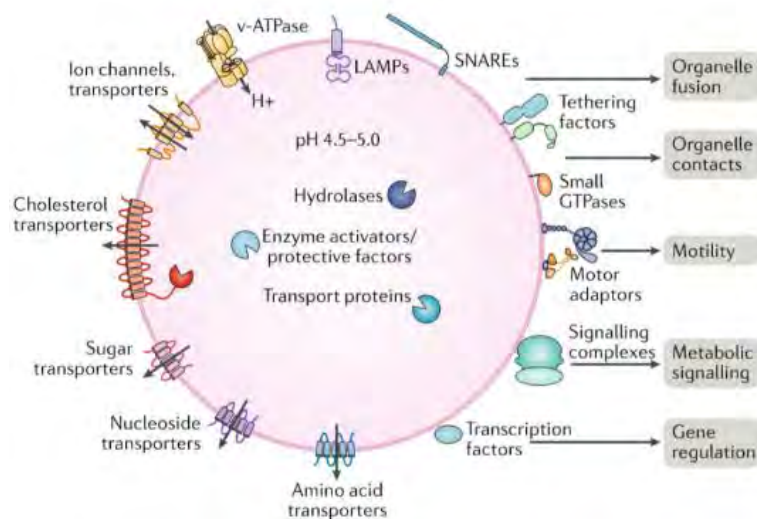
Le lysosome participe aussi au bon fonctionnement du SI, en permettant la présentation des peptides par le SII, via les CMH.II pour le SIA et la mise en place d'une réponse adaptative. Les cathepsine S et L (des cystéines protéases lysosomales) présentent dans les macrophages, dans leur compartiment lysosomal et endosomal sont importantes pour la régulation de la présentation des antigènes par les molécules du CMH.I et CMH.II (Honey et Rudensky 2003).



**Figure 34: La voie de présentation du CMH de classe II mature à la membrane plasmique.** Hétérodimère ( $\alpha\beta$ ) de CMH II est assemblé dans le RE (réticulum endoplasmique) avec l'aide de la chaîne invariante (Ii). La partie cytoplasmique de Ii contient un motif qui permet son adressage dans le compartiment endosomal en passant par le trans golgi (TNG), puis à la membrane plasmique et enfin vers les endosomes précoces. Le complexe li-CMHII à la membrane plasmique est rapidement internalisé et accède ainsi au compartiment des endosomes. La maturation des endosomes se fait par activation des enzymes lysosomales (par acidification de sa lumière) qui dégradent les protéines dont la chaîne invariante Ii. En parallèle de cette activité protéolytique, il y a une dégradation des peptides exogènes et rupture des ponts disulfure. Après clivage de Ii, il demeure dans le sillon du CMHII le peptide CLIP (class-II-associated invariant chain peptide) qui empêche une association d'un peptide prématuré. L'élimination de CLIP et la mise en place du peptide est médié par h-M2 (MHC-like molecule H-2M). Le peptide sur le CMH.II mature sera alors adressé à la membrane plasmique. Illustration issue de la publication de Karen Honey en 2003 (Seattle- USA) (Honey et Rudensky 2003).

Dans les cancers, il est observé une diminution de l'expression de la sous-unité du lysosome Atp6v0d2 dans les TAM (N. Liu et al. 2019). Les animaux Atp6v0d2<sup>-/-</sup> sont plus susceptibles de développer des cancers que les WT, par une sur production de VEGF par les TAM, médiée par HIF2 $\alpha$ . Chez l'Homme, une forte expression de Atp6v0d2 est corrélée à la survie des patients (N. Liu et al. 2019). Le lactate est libéré par les cellules tumorales, active mTORC1, ce qui inhibe l'expression de la sous-unité V0D2 de la pompe à proton. Cette inhibition de l'expression des sous unités de la pompe est dépendante de la rétention du FdT TFEB dans le cytoplasme (N. Liu et al. 2019). L'absence de la sous-unité (Atp6v0d2), de façon spécifique aux macrophages entraîne une accumulation de mitochondries altérées, avec une activation de l'inflammasome, et une diminution de clairance du pathogène *Salmonella typhimurium* lors d'un sepsis (Xia et al. 2019). Xia et collègues ont découvert que l'Atp6v0d2 n'est pas nécessaire à l'acidification du lysosome (activité de la pompe à proton) mais permet la fusion du lysosome à l'autophagosome via son interaction avec STX 17 et VAMP8 (protéines du trafic vésiculaire du lysosomes) (Xia et al. 2019).

Une dysfonction de la physiologie des lysosomes a des répercussions dans plusieurs maladies comme les LSD, les cancers, et les sepsis. Elles sont dues à un défaut, d'autophagie, de mitophagie, ou de phagocytose respectivement. La physiologie des lysosomes régule l'immunométabolisme du macrophage.



**Figure 35: Le lysosome est un organe important dans la signalisation intracellulaire** : Le lysosome comporte un ensemble de protéines spécifiques. Sa lumière contient des hydrolases acides qui dégradent les différents substrats. Le pH acide de sa lumière est maintenu par l'ATPase vacuolaire (v-ATPase) ancré dans sa membrane. Cette même membrane comporte des protéines avec des hauts niveaux de glycosylation les LAMPs (Lysosome-Associated Membrane Proteins) qui ont pour but de protéger la membrane et empêcher qu'elle ne se dégrade. Les transporteurs ioniques maintiennent l'homéostasie. D'autres transporteurs assurent l'export des sucres, des nucléosides, des acides aminés, et autres produits de dégradation du lysosome. Les SNAREs sont impliquées dans la fusion du lysosome aux autres organites. Sa surface cytosolique sert de plateforme pour la signalisation, notamment avec mTORC1 pour ce qui est de la détection des nutriments et les signaux de croissances. Il y a aussi des facteurs de transcription comme TFEB et TFE3 qui régulent la biogénèse lysosomale, l'autophagie et le métabolisme énergétique. Issue de Ballabio (Naples-Italie) (Ballabio et Bonifacino 2019).

## II. Le lysosome : un carrefour entre la nutrition et l'immunité (mTOR)

Lors de leurs activations les cellules immunes présentent d'importants changements morphologiques et métaboliques contrôlés par l'axe mTORC1-mTORC2. mTOR est une sérine/thréonine kinase au centre catalytique de 2 complexes différents, mTORC1 et mTORC2. Le complexe mTORC1 est le détecteur de nutriments de la cellule. Le complexe mTORC2 est impliqué dans le métabolisme cellulaire et le cytosquelette.

L'activation de ces complexes a lieu chez les macrophages après reconnaissance du GM-CSF (Weichhart, Hengstschläger, et Linke 2015). Leur activation contrôle la synthèse protéique, la croissance cellulaire et le métabolisme anabolique (Weichhart, Hengstschläger, et Linke 2015). L'IL-4 induit l'activation de mTORC1 et mTORC2 par les macrophages murins. 4 heures après stimulation au LPS il y a une importante synthèse protéique due à la voie (PI3K)-mTORC1 chez les macrophages murins (Ivanov et Roy 2013). Cette étude montre que lors d'une infection par la bactérie intracellulaire *Legionella pneumophila* dans des macrophages il y a une diminution de l'activité de mTOR, associé à une traduction importante des ARNm coiffés codant pour les cytokines inflammatoires (notamment celui de l'IL-6) (Ivanov et Roy 2013). Le complexe mTORC1 entraîne la phosphorylation de 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) qui libère le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) des ARNm. L'activation de mTORC1 entraîne habituellement des réponses anaboliques au travers d'HIF1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  (Mathieu Laplante et Sabatini 2012) ;(Inoki, Kim, et Guan 2012).

Lors de l'endocytose de nutriments (acide aminés) la déplétion de sous unité de la v-ATPase bloque le recrutement de mTORC1 à la membrane du lysosome et diminue son activation (Mathieu Laplante et Sabatini 2012). La v-ATPase interagit directement avec le complexe Ragulator (composé de 5 protéines LAMTOR 1 à LAMTOR 5), formant une plateforme pour les GTPase Rag (permettant le recrutement de mTORC1) à la surface des lysosomes. Les GTPase Rag permettent également le recrutement d'autres facteurs à la surface du lysosome. Le TSC (tuberous sclerosis complex) est un régulateur négatif de mTORC1, ou encore FLCN et FNIP qui comme TFEB sont des gènes clés de la biogenèse lysosomale et de l'autophagie (Ballabio et Bonifacino 2019).

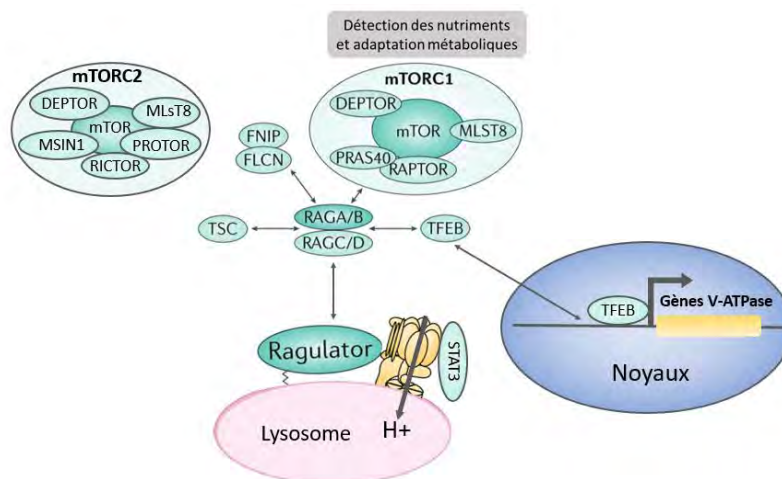
L'activité de la pompe apparaît essentielle pour transmettre la présence d'acide aminés au complexe Ragulator/GTPaseRag puis mTORC1 (Mathieu Laplante et Sabatini 2012). Mais le mécanisme précis reste inconnu. De façon surprenante la voie de mTORC1 régule l'expression de la v-ATPase suggérant un boucle de régulation entre mTORC1 et la fonction lysosomale (Mathieu Laplante et Sabatini 2012) (Peña-Llopis et al. 2011) (Düvel et al. 2010).

Historiquement, il était convenu que le signal activateur de mTORC1 était la présence des nutriments. En 2011 Peña-Llopis et collègues ont publié un nouveau lien entre mTORC1 et la v-ATPase (Peña-Llopis et al. 2011). Leur publication dans PNAS illustre que mTORC1 régule plusieurs ensembles de gènes lysosomaux, comme ceux codant les sous unités de la V-ATPase (*in vitro*, *in vivo*) (Peña-Llopis et al. 2011). Cette régulation de mTORC1 sur les gènes lysosomaux passe par le FdT TFEB (Peña-Llopis et al. 2011). La V-ATPase se lie aussi à d'autres FdT. En effet, Liu et collègues en 2018 ont démontré que STAT3 s'associe physiquement à la pompe à proton par son domaine coiled-coil et induit l'augmentation de l'activité de la pompe (B. Liu et al. 2018). A l'inverse, l'absence de STAT3 perturbe l'équilibre de la pompe ce qui augmente le pH du lysosome (B. Liu et al. 2018). Le rôle du complexe mTORC1/v-ATPase dans l'immunométabolisme des cellules immunes est un champ de recherche vaste et il reste de nombreux territoires à explorer (**Voir figure 36**).

L'inhibition de mTORC1 (par délétion de Raptor (qui code pour les protéines régulatrices de mTOR (RAPTOR))) dans les DCs entraîne une importante réponse inflammatoire par ces dernières suite à un traitement au DSS (dextran sulfate sodium) (Ohtani et al. 2012). En accord avec Ohtani et collègues l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine, dans les macrophages humains, augmente leur polarisation M1 (MerCALLI et al. 2013). La forme constitutivement active de PI3K-mTOR entraîne une plus forte

réponse de la polarisation M2 (via l'activation de STAT6) (Sahin et al. 2014). Des souris avec la forme de mTOR constitutivement active (souris *Tsc1*<sup>-/-</sup> ; complexe protéique qui antagonise la fixation de mTORC1 sur Regulator) présentent des macrophages réfractaires à une polarisation M2 induit par l'IL-4 et sont plus prônes à développer un phénotype inflammatoire en condition M1 (LPS) (Byles et al. 2013). De plus, mTORC1 entraîne une diminution d'Akt (essentielle à la polarisation M2 (Byles et al. 2013)). Cette étude montre comment la détection des nutriments par mTORC1 et l'activation des voies sous-jacentes peut contrôler la polarisation des macrophages (Byles et al. 2013).

Chez les patients atteints de NASH sévère on observe des macrophages avec peu d'activité de mTORC1. Par cette faible activité mTORC1 il n'y a pas de réponse de type M2 dans les macrophages il y a donc davantage d'inflammation (induite par les KC) par rapport aux patients avec un NASH moyen (W. Liu et al. 2019). Liu et collègues, dans l'équipe de Ding Ai ont montré dans les macrophages au cours de la phagocytose, que mTOR induit la lipolyse dépendant du lysosome, ce qui promeut la polarisation vers le phénotype M2 grâce entre autres à la protéine DRP1 (W. Liu et al. 2019). La phagocytose active mTORC1 qui se couple à DRP1, ensemble ils favorisent la fission mitochondriale, ce qui libère du calcium et augmente sa concentration cytosolique ce qui favorise l'acidification du lysosome, et donc la lipolyse associée aux lysosomes, qui alimente la réponse M2 (W. Liu et al. 2019). D'autres papiers illustrent que la phagocytose d'ACs par les macrophages active la voie mTORC1. Cette dernière peut être protectrice vis-à-vis de la progression du NASH en diminuant l'inflammation hépatique (S. C.-C. Huang et al. 2014).

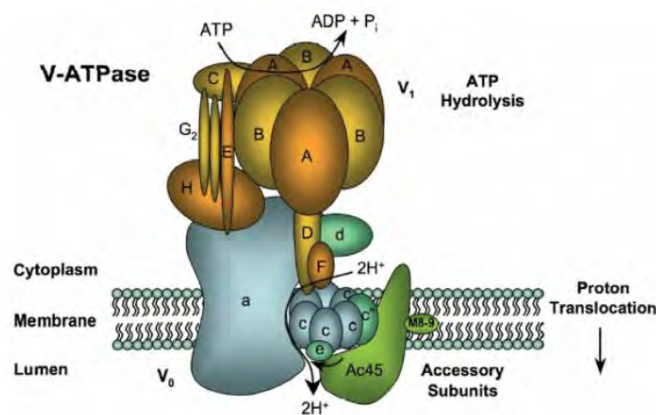


**Figure 36: La pompe v-ATPase, une plateforme pour le métabolisme du macrophage.** La pompe à proton (v-ATPase) maintient un pH acide dans le compartiment luminal. Plusieurs événements s'initient à la surface du lysosome. Les protéines RAG-GTPase médient l'association dynamique de plusieurs complexes par leur association à Ragulator ancré à la surface du lysosome. Les protéines RAG-GTPase permettent le recrutement de TSC (tuberous sclerosis complex), FLCN (folliculin) et FNIP (FLCN-interacting protein). Le FdT STAT3 s'associe physiquement à la pompe à proton v-ATPase par son domaine coiled-coil et induit l'augmentation de son activité de cette dernière. A l'inverse, l'absence de STAT3 perturbe l'équilibre de la pompe ce qui augmente le pH du lysosome. Adapté de Ballabio et collègues (Naple - Italie) (Ballabio et Bonifacino 2019); (Daejeon - Corée du Sud) (Kim et Lee 2019); (Cambridge -USA) (Condon et Sabatini 2019); (Dallas -USA) (Peña-Llopis et al. 2011); (Copenhague, Denmark) (W. Liu et al. 2019).

### III. L'acidification du lysosome est un élément central dans la physiologie du macrophage

L'acidification du lysosome permet l'autophagie (élimination d'agrégats protéiques et d'organites comme des mitochondries altérées) afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et empêcher une inflammation. Pour ce faire, la pompe à protons va acidifier la lumière du lysosome afin d'activer les hydrolases acides. Il s'agit d'un large complexe de sous-unités composées d'une partie cytosolique V1 (8 sous-unités qui hydrolysent l'ATP) et une partie transmembranaire V0 responsable de la translocation du proton (7 sous-unités). V1 (640 kDa) possède 8 sous-unités de A-H et la V0 (260 kDa) possède au moins 4 sous-unités différentes (a, b, c, d, e) et 2 sous-unités accessoires (Ac45 et M8-9) (Yao et al. 2007).

Cette ATPase est la seule molécule capable de diminuer le pH de la lumière du lysosome. La valeur pH du phagolysosome est quelque chose de très mobile chez les macrophages. Dix minutes après ingestion du pathogène le pH du lysosome, passe d'une valeur de 6 à 5,4 alors que le pH dans le cytosol est entre 7 et 7,4 (Dragotakes et al. 2020).



**Figure 37: Vision schématique de la v-ATPase.** Il s'agit d'un complexe composé d'une partie périphérique V1 et d'une partie transmembranaire la V0. La sous-unité V1 est composée de huit sous-unités différentes (A-H) et est responsable de l'hydrolyse de l'ATP. Le domaine V0 est composé de quatre sous-unités différentes (a, c, d, et e) responsables de la translocation du proton au travers de la membrane. De plus deux autres sous-unités Ac45 et M8-9 existent aussi mais leur structure et leur site de liaison aux autres domaines restent à déterminer issue de Yao et collègues (Guang Dong - Chine) (Yao et al. 2007).

**Structure de la V1 :** Sous-unité A et B : les 3 sous-unités A (69 kDa) et les 3 sous-unités B (60 kDa) de la partie V1 forment le centre catalytique et non catalytique respectivement. La sous-unité C, permet la formation et l'ancrage des sous-unités A et B à la membrane vacuolaire. La sous-unité D : est importante au couplage du transfert de proton et de l'hydrolyse de l'ATP. La sous-unité E (31 kDa) existe sous 2 isoformes dans l'ATPase-V (E1 et E2). La sous-unité F : Sa perturbation avec un anticorps spécifique résulte en un phénotype nul de la v-ATPase, elle est donc essentielle au fonctionnement de ce complexe multiprotéique. La sous-unité G : joue un rôle dans la prévention de la rotation de la sous-unité A, elle régule l'activité. La sous-unité H : elle fait (54,4 kDa), elle est hydrophobe et se retrouve donc ancrée dans le complexe protéique (Yao et al. 2007).

**Structure de la V0 :** La sous-unité a : (116 kDa) présente trois différents isoformes (a1, a2, a3). La sous-unité c : (16 kDa) existe sous trois isoformes (c, c', c'') et le rôle des sous-unités c' et c'' reste inconnu. La sous-unité d : ne présente pas de domaine transmembranaire. La sous-unité e (9.2kDa) est retrouvée associée au complexe V0 et à celui formé par la V1V0, ce qui confirme sa présence dans la structure mature de l'ATPase-V. Ac 45 (62 kDa) est une sous-unité transmembranaire accessoire de la v-ATPase (Yao et al. 2007).

La physiologie du lysosome est complexe. L'activité de protéolyse lysosomal qui en découle est, régulée par des programmes transcriptomiques, eux-mêmes régulés par des FdTs clés. Ces FdTs sont donc directement impliqués dans l'activité protéolytique et la polarisation des phagocytes, qui tous les deux influencent le bon déroulé de la réaction inflammatoire.

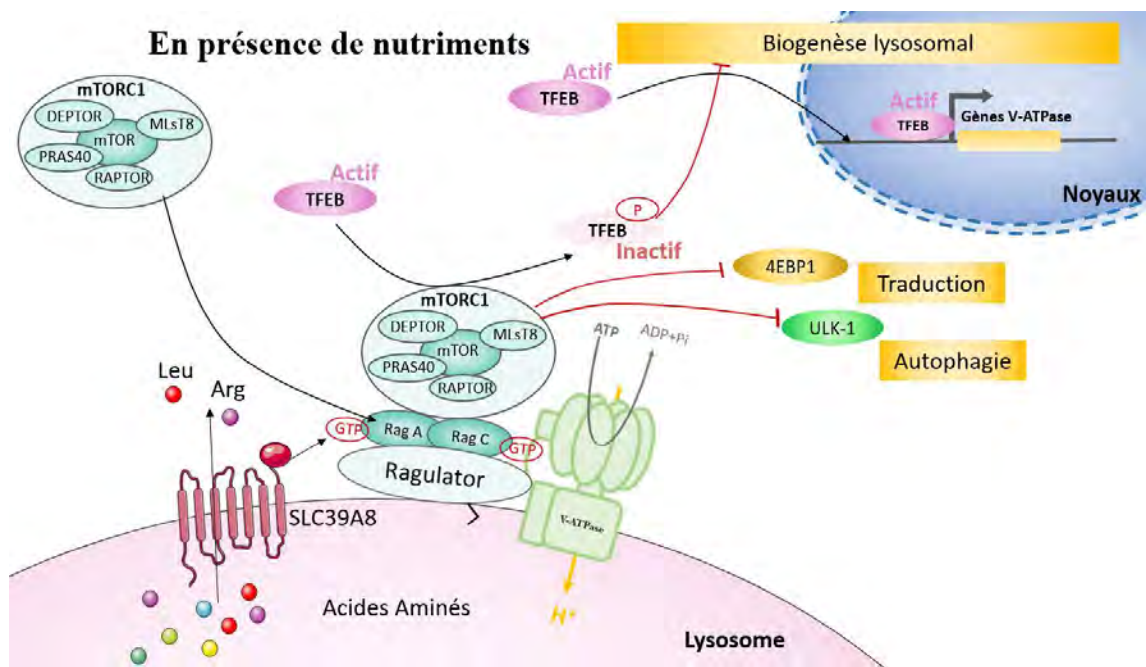
De nombreux travaux ont permis de mieux comprendre ces FdTs dans la physiologie/fonction du macrophage, au-delà même de leur activité protéolytique. Leur mécanisme d'action sur la chromatine est un champ de recherche en pleine expansion ces dernières années. Cette expansion est soutenue grâce à l'avènement de nombreuses techniques conjuguées au séquençage haut-débit pour mieux étudier le rôle des FdTs. Parmi ces techniques nous retrouvons l'immuno-précipitation de chromatine (Ch-IP), le séquençage des ARNm (RNA-Seq) sur le bulk, mais aussi à l'échelle de la cellule unique (Single cell RNA-Seq), ainsi que l'ATAC-Seq (pour Assay for transposase accessible chromatin Sequencing) et le GRO-Seq (pour Global Run On sequencing) qui permettent une vision plus fine de l'état de transcription de la cellule à un temps donné (Lopes, Agami, et Korkmaz 2017). C'est-à-dire, dans un état de chromatine compactée, dépourvu de nucléosome, et propice à la transcription.

Ensemble, ces techniques permettent d'étudier de façon précise les différents rôles des FdT en lien avec la dynamique chromatinienne, dans la polarisation des macrophages. Dans la partie suivante, je vais aborder une famille de FdT qui me semble importante, dans le cadre de mes recherches, et qui est impliquée dans la régulation de la physiologie des lysosomes. Dans un second temps, je vais aborder certains des FdT impliqués dans les polarisations M1, puis d'autres impliqués dans la polarisation M2. J'ai choisi de vous présenter 4 FdT impliqués dans la polarisation du M1, et 4 FdT dans la polarisation du M2, qui me semblent à ce jour pertinent.

#### IV. Le facteur de transcription lysosomal TFEB

Le facteur de transcription **TFEB** fait partie de la famille : MiT-TFE. Cette famille comprend 4 membres : TFEB, TFE3, TFEC et MITF. Une fois dans le noyau ces FdT reconnaissent des séquences d'ADN palindromique (CACGTG) localisées à proximité des gènes cibles (Puertollano et al. 2018). Les 4 membres régulent la biogénèse des lysosomes et l'autophagie, mais les plus exprimés et ceux pour lesquels la bibliographie est la plus riche, sont TFEB et TFE3 (Puertollano et al. 2018). Je ne vous présente ici que le rôle d'action de TFEB. Sa régulation est complexe et fait intervenir mTORC1 et le lysosome (Condon et Sabatini 2019). En effet l'association du complexe mTORC1 au lysosome permet la phosphorylation de TFEB (Condon et Sabatini 2019).





**Figure 38 : régulation du FdT TFEB par la détection des nutriments et le complexe mTORC1.** En présence de nutriments (endocytose) des protéines « sensors » comme SLC38A9 et la v-ATPase permettent la détection des a.a. Ceci passe par la modification des GTP des RAG. Lorsqu'elles sont associées à un GTP, elles permettent le recrutement de mTORC1. Lorsque mTORC1 est à la membrane du lysosome il entraîne la phosphorylation de divers facteurs, dont TFEB et l'inactive et le séquestre dans le cytosol. Cette inhibition de TFEB, entraîne une diminution de son effet positif sur la biogenèse lysosomal (Condon et Sabatini 2019). Le recrutement de mTORC1 à la membrane du lysosome passe par divers « sensors » comme SLC38A9 et la v-ATPase. Le port que forme SLC38A9 est essentiel pour la détection de l'Arginine lysosomal. Ce canal permet à mTORC1 de détecter la présence de cette acide aminé, ceci par la régulation des Rag et Raptor (Wyant et al. 2017). La v-ATPase interagit avec les sous unités régulatrices de Rag-B et ragulator et influence, en présence de nutriments, l'acquisition d'un GTP sur les Rag-B, ce qui permet le recrutement de mTORC1 (Zoncu et al. 2011) (Condon et Sabatini 2019); (Martina et al., s. d.). Illustration bilan, issue des publications de Roberto Zoncu (Cambridge-USA) (Zoncu et al. 2011) de Kendall J. Condon (Cambridge-USA) (Condon et Sabatini 2019); de Jose A. Martina (Bethesda-USA) (Martina et al., s. d.) et de Gregory Wyant (Cambridge –USA) Raptor (Wyant et al. 2017).

La relocalisation de TFEB survient lors des fluctuations du taux de nutriments, et de divers stress que subit la cellule. TFEB est sujet à des modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations réalisées notamment par : mTOR et ERK (Puertollano et al. 2018). En présence de nutriments mTOR (dans le complexe mTORC1) phosphoryle TFEB et limite ainsi sa localisation cellulaire au cytoplasme (Condon et Sabatini 2019). Lorsque mTORC1 est inhibé (lors de la détection de LPs par les macrophages (Pastore et al. 2016)), TEFB se retrouve dans le noyau, et favorise la biogenèse lysosomale et l'expression des sous-unités de la pompe v-ATPase (Puertollano et al. 2018); (Peña-Llopis et al. 2011).

Un des acteurs qui permet d'adresser mTORC1 à la membrane du lysosome (et qui permet la phosphorylation de TFEB) est la pompe v-ATPase elle-même. Une expérience d'interférence de l'ARNm de TFEB par des shRNA entraîne une diminution de l'expression des sous unités de la v-ATPase (Puertollano et al. 2018).

L'équipe de Pr. David Sabatini étudie mTOR et ses rôles en physiologie depuis plus de 20 ans. Il a, avec Mathieu Laplante, signé une revue sur le rôle mTOR dans le métabolisme cellulaire en 2009 (M. Laplante et Sabatini 2009). Dix ans plus tard, il a écrit une nouvelle version des mécanismes de détection des nutriments et leurs régulation sur mTOR (Condon et Sabatini 2019). En 10 ans de recherche la compréhension de mTOR est devenue plus complexe, avec un adressage au lysosome et l'interaction avec différents partenaires protéiques (v-ATPase, SLC38A9), qui ensemble permettent l'activité kinase de mTOR. De la même façon l'équipe d'Andrea Ballabio a montré en 2011 que le manque de nutriments

dans le milieu de culture, active les programmes transcriptionnels de l'autophagie ceci promu par la translocation de TFEB dans le noyau (Settembre et al. 2011).

L'adressage de TFEB au noyau et son activité semble être rattachés à un phénotype « pro-M1 » (Pastore et al. 2016) ; (M. A. Gray 2016) ou à une privation de nutriments, (Settembre et al. 2011) ou encore à la défense contre les infections (Visvikis et al. 2014). A l'inverse, son inhibition serait plutôt pro-tumorale (Fang et al. 2017) et ou pro M2 (B. Liu et al. 2018).

Ce qui est contre intuitif, quand on sait le besoin de la FAO en lipolyse lysosomale impliqué dans la polarisation M2. Il semble donc qu'en M2, d'autres FdTs (notamment STAT3 (B. Liu et al. 2018)) sont impliqués dans la promotion de l'activité de lipolyse acide du lysosome importante pour le phénotype M2 (Viaud et al. 2019). Cette différence d'activité du lysosome entre le M1 et le M2 est soulignée dans la publication de Canton et collègues de 2014. En effet, il existe une forte différence entre le pH du M1 (acide) et celui du M2 (neutre) dans le phagosome dû à la production de ROS plus importante à l'intérieur du phagosome (par la NADPH oxydase) chez le M1, par rapport au M2 (Canton et al. 2014). Certains articles soulignent une possible boucle de régulation entre la phosphorylation de TFEB médiée par mTORC1 à la surface du lysosome, ce qui inhibe l'expression de la v-ATPase (elle-même impliqué dans l'adressage de mTORC1 au lysosome) (Peña-Llopis et al. 2011). Cette régulation est difficilement compatible avec le fait qu'en M2 un macrophage utilise la FAO et a donc besoin d'une lipolyse lysosomale efficace (S. C.-C. Huang et al. 2014) ; (Viaud et al. 2019). De plus, une diminution de l'activité de TFEB favorise la polarisation vers le M2 (induit par STAT3) (B. Liu et al. 2018). STAT3 est montré comme interagissant directement avec la v-ATPase ce qui améliore son activité d'acidification, ce qui soutient les besoins de FAO, lors de la polarisation M2 (B. Liu et al. 2018). Il semblerait donc que la polarisation M2, et leur activité de phagocytose soient indépendantes du facteur TFEB. Ceci est appuyé par une publication qui illustre que dans les TAM, dû à la forte présence de TGF- $\beta$  et lactate, il y a une activation de la kinase ERK1/2, qui phosphoryle donc TFEB, et inhibe son action nucléaire (Fang et al. 2017).

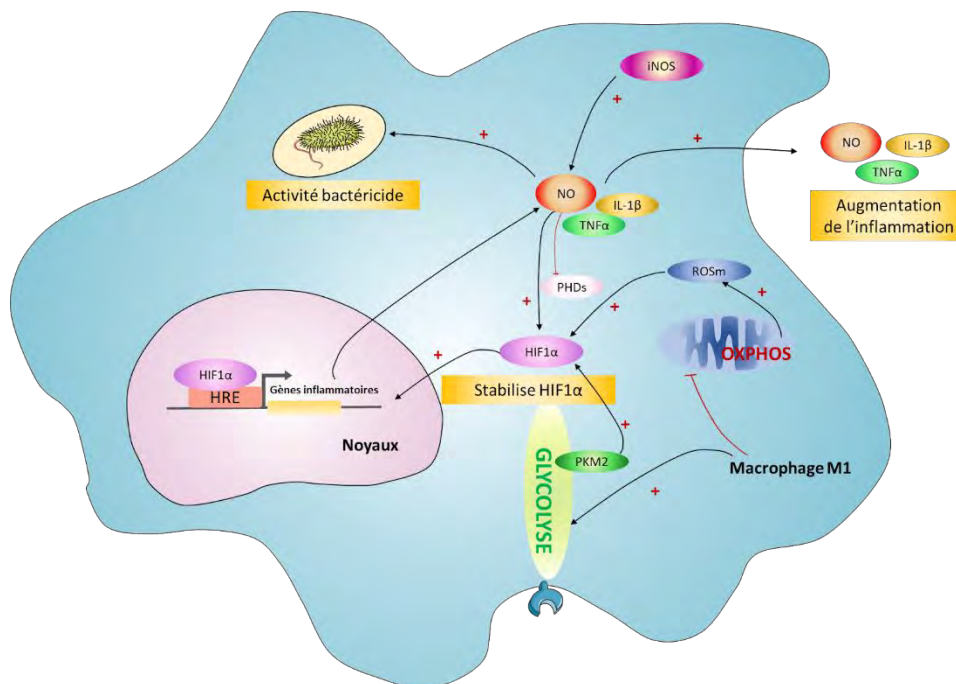
A l'inverse de la polarisation M2, il a été montré que TFEB est impliqué dans la défense anti-infectieuse notamment contre *Staphylococcus aureus* dans le modèle animal de *Caenorhabditis elegans* (Visvikis et al. 2014). Visvikis et ses collègues ont découvert que HLH-30 (l'homologue de TFEB chez les mammifères) voit son expression augmentée lorsque *C.elegans* détecte *S. aureus*. L'induction de HLH-30 est nécessaire pour la lutte de l'hôte contre une infection (Visvikis et al. 2014).

Malgré la distance évolutive évidente qu'il y a entre *C.elegans* et *Homo sapiens*, mTORC1 peut jouer un rôle dans la réponse immunitaire contre l'infection (en permettant et soutenant la polarisation M1) (Haloul et al. 2019). Mais le rôle de mTORC1 dans l'inflammation est à comparer à celui d'autres FdT bien plus important dans la polarisation M1.

## F. Les facteurs de transcription

### I. Les facteurs de transcription de la polarisation M1

**HIF1 $\alpha$** : pour (Hypoxia Inducible Factor). Il est le « master gène » de la régulation de l'angiogenèse par l'hypoxie. HIF1 est un hétérodimère composé de HIF1 $\alpha$  et HIF1 $\beta$ . Ils ont été initialement découverts dans le noyau, en condition d'hypoxie pour promouvoir l'expression du gène codant pour l'érythropoïétine (EPO). Dans le noyau HIF se lie à l'ADN au niveau de séquences dites HRE (hypoxia response elements). Son rôle dans le noyau participe à la libération de de TGF- $\beta$ , de métalloprotéase et de facteur de croissance comme le VEGF-C (Pugh et Ratcliffe 2003). HIF1 $\alpha$  dans les macrophages est impliqué dans la polarisation M1 et la réponse inflammatoire (Tannahill et al. 2013). En effet sur les sites inflammatoires, HIF1 $\alpha$  est stabilisé, par divers éléments : le NO, Le succinate, la diminution de la pO $_2$ . Le NO inhibe les prolyl-hydroxylases (PHDs), ce qui entraîne la dégradation de HIF1 $\alpha$ . Le NO est produit en grande quantité par l'iNOS (elle-même positivement régulée par le FdT NF $\kappa$ B dont je parlerai un peu plus tard) présent chez les macrophages inflammatoires. HIF1 $\alpha$  est aussi retrouvé dans la réaction inflammatoire (bactéricide via la production de NO) et la polarisation M1 (via l'initiation de la glycolyse en aérobie) (Peyssonaux et al. 2005; Tannahill et al. 2013; Viola et al. 2019; Düvel et al. 2010; Chandel et al. 2000; Martínez-Reyes et Chandel 2020; L. Yang et al. 2014).



**Figure 39: Rôle du FdT HIF1 $\alpha$  dans la polarisation M1 du macrophage au cours de la réponse inflammatoire.** Lors de la polarisation M1, les altérations métaboliques, le CK brisé, et l'augmentation de la glycolyse, la production de ROSm, l'activité des iNOS entraînent la production de NO. Ce dernier peut exercer une activité bactéricide propre (nitrosylation) mais aussi entraîner la stabilisation du facteur HIF1 $\alpha$  qui peut alors aller dans le noyau pour promouvoir une plus ample réponse inflammatoire, par l'expression de cytokines (IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ ). Illustration bilan issue de Carole Peyssonaux (California-USA) (Peyssonaux et al. 2005); (GM Tannahill Dublin) (Tannahill et al. 2013); Navdeep Chandel (Chicago-USA) (Chandel et al. 2000); Inmaculada Martínez-Reyes (Chicago –USA) (Martínez-Reyes et Chandel 2020); Antonella Viola (Padova-Italie) (Viola et al. 2019); Liangchun Yang (Hunan – Chine) (L. Yang et al. 2014).

**IRF5**: pour “Facteurs régulateur de l'interféron”. Il fait partie d'une famille composée de 9 membres qui furent découverts à la fin des années 1980 lors des recherches sur l'interféron de type I. Tous possèdent un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal. Ce domaine de liaison à l'ADN reconnaît les séquences des éléments réponses aux stimuli d'IFN (ISRE pour IFN-stimulated response element) qui

correspondent à la séquence ANGAAANNGAAACT (Tamura et al. 2008) ;(Lawrence et Natoli 2011). IRF5 est majoritairement cytoplasmique, il est phosphorylé lors de la reconnaissance d'une infection virale suivant l'activation des TLRs et la transduction du signal via MyD88 (Takaoka et al. 2005). Cette phosphorylation lui permet d'être adressée directement au noyau, où il induit l'expression de cytokines inflammatoire (IL-12p40, IL-6, et TNF- $\alpha$ ) (Tamura et al. 2008) ;(Takaoka et al. 2005). Il participe donc à la polarisation M1, tout en réprimant les transcrits de type M2 (promeut l'expression de l'IL-12 et inhibe l'expression de l'IL-10) (Krausgruber et al. 2011). De plus, des polymorphismes sur le gène d'*Irf5* sont associés à plusieurs maladies auto-immunes (Lawrence et Natoli 2011). Les animaux *Irf5*<sup>-/-</sup> sont résistants face aux endotoxines, ce qui souligne le rôle prépondérant de ce FdT dans la réponse inflammatoire (Krausgruber et al. 2011). En effet IRF5 induit l'expression des gènes inflammatoires comme TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 et IL-23.

**NF $\kappa$ B** (pour Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)) fait partie d'une famille de FdT composée de 5 membres. (NF- $\kappa$ B1 (ou p50) ; NF- $\kappa$ B2 (ou p52), RelA (ou p65), RelB, c-Rel (qui porte le domaine de liaison à l'ADN) (T. Liu et al. 2017). Ce FdT est le « master gene » de la réponse immune adaptative et innée. De plus, il est aussi le médiateur de la réponse inflammatoire, en induisant l'expression de très nombreux gènes pro inflammatoires (T. Liu et al. 2017). Dérégulée, la voie NF-kappaB entraîne des altérations pathologiques de l'inflammation. NF- $\kappa$ B est normalement séquestré dans le cytoplasme grâce à sa liaison inhibitrice avec I $\kappa$ B. L'activation NF- $\kappa$ B implique deux voies d'activation, une canonique, et une autre non-canonique (que je ne vais pas présenter ici du fait de sa faible contribution dans la réponse inflammatoire par rapport à la voie d'activation dite canonique). La voie canonique NF- $\kappa$ B, suite à la liaison de divers peptides à leurs récepteurs (TNFR, TLR ou IL-1beta) entraîne la dégradation, via le protéasome, du partenaire inhibiteur I $\kappa$ B. Ceci aboutit à une rapide et transitoire relocalisation de NF- $\kappa$ B dans le noyau où il induit l'expression de plusieurs cytokines inflammatoires (Tugal, Liao, et Jain 2013).

**STAT1** : (pour Signal Transducers and Activators of Transcription) fait parti d'une famille composée de 7 membres (Ihle 2001). Tous les membres de cette famille possèdent un domaine SH2 (src-homology 2) qui permet la liaison à des phosphotyrosines. Ce domaine, une fois phosphorylé (par divers acteur de la signalisation en aval du récepteur à l'IFN $\gamma$ ) permet aux protéines STAT de se dimériser (en homodimère ou hétérodimère) et de façon concomitante d'entrer dans le noyau où il se lie aux séquences activatrices présentes sur les promoteurs des gènes NOS2, CMHII et IL12b entre autres (Lawrence et Natoli 2011); (Tugal, Liao, et Jain 2013); (Ihle 2001) ;(Nathan 2002);(Ihle 2001).

## II. Les facteurs de transcription de la polarisation M2

**LXRs** pour (Liver X receptor) existe sous 2 isoformes les LXRs (LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ ), avec plusieurs séquences communes et elles reconnaissent les mêmes ligands (Hong, s. d.). LXR $\alpha$  est exprimé dans les tissus et cellules métaboliquement actives comme les hépatocytes, les entérocytes, les adipocytes, et les macrophages. Alors que LXR $\beta$  est exprimé de façon ubiquitaire (Hong, s. d.). Leur activité de transcription nécessite leur hétérodimérisation avec RXRs (retinoid X receptors). La liaison de cet hétérodimère à l'ADN est médiée par les zones LXRE (LXR response element) qui sont des répétitions de (AGGTCA) séparés par 4 nucléotides (Hong, s. d.). L'activation de sa voie (par l'utilisation d'un agoniste (T0901317 and GW3965) atténue la progression de l'inflammation et entraîne l'arrêt de la migration des neutrophiles (D. G. Thomas et al. 2018). Cet arrêt de migration est associé à un efflux de cholestérol qui diminue le recrutement des monocytes lors d'une péritonite. Par un ATAT-Seq (pour assay for transposase accessible chromatine) ils ont montré que LXR $\alpha$  dans le noyau diminue

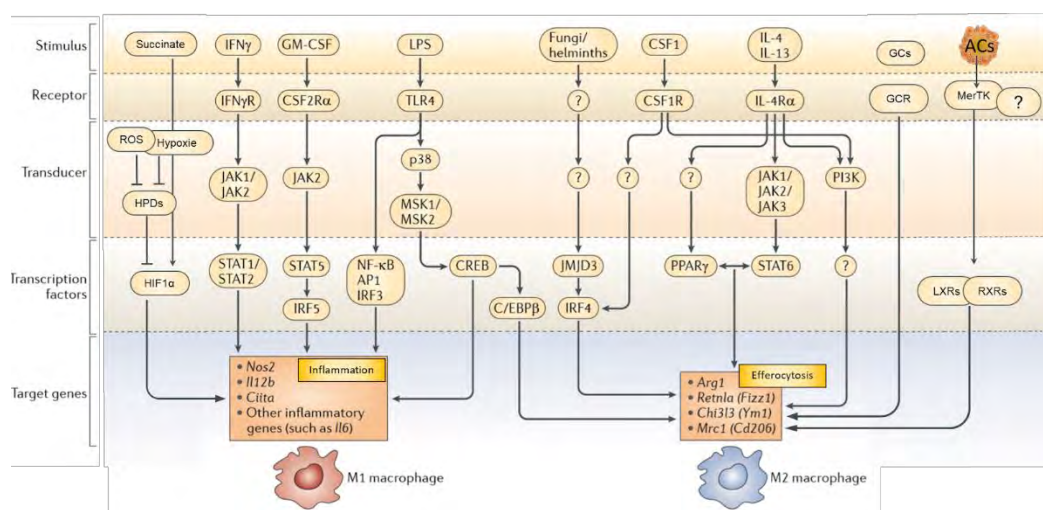
l'accessibilité des « hépatocytes » qui régulent les gènes de l'inflammation (D. G. Thomas et al. 2018). Les mêmes effets ont été observés lors de l'étude de LXR sur l'inflammation intestinale. Le traitement avec des agonistes de LXR réduit la perte de poids au cours des colites inflammatoires induites par un traitement au DSS (Dextran sulfate sodium) (Yu et al. 2016). A noter que l'utilisation de l'agoniste de LXR $\alpha$  (T0901317) entraîne une stéatose hépatique (Yu et al. 2016). D'autres études se sont donc intéressées au foie et le rôle de LXR lors de la survenue du NASH. Seidman et ses collègues ont publié que lors du NASH, les KC subissent un remaniement génétique profond, qui altère leur identité et conduit à leur mort (Seidman et al. 2020). La niche hépatique, après la mort de KC est investie par les monocytes dérivés du sang, qui une fois dans le foie acquièrent un épigénome, un transcriptome et des fonctions cellulaires qui convergent avec celui des KC (Seidman et al. 2020). Cette altération de l'identité des KC est en partie due à LXR $\alpha$  et ATF3 qui participent au phénotype altéré des KC dans le NASH (Seidman et al. 2020). LXR est aussi impliqué dans l'élimination des ACs par les macrophages et l'immuno tolérance (A-Gonzalez et al. 2010). L'efférocytose induit l'expression de LXR, qui favorise l'expression de MerTK (A-Gonzalez et al. 2010). Les animaux LXR $^{-/-}$  dans les macrophages présentent une inflammation augmentée par rapport aux WT, et une efférocytose dépendante de MerTK diminué (A-Gonzalez et al. 2010). Le traitement avec un agoniste du LXR diminue la réponse inflammatoire, dans un modèle souris de Lupus chez la souris (A-Gonzalez et al. 2010).

De façon générale, LXR $\alpha$  est donc un fdT qui favorise la polarisation M2 par la diminution de l'inflammation et du recrutement des neutrophiles, mais aussi en favorisant l'efférocytose.

**PPAR- $\gamma$**  pour "Peroxisome Proliferator Activated Receptor." Chez les mammifères il y a 3 sous-types de PPAR ( PPAR $\alpha$  PPAR $\gamma$  PPAR $\delta$ ) (Chawla 2010). PPAR- $\gamma$  est un "master gene" dans la régulation du métabolisme lipidique dans le macrophage et inhibe le phénotype M1 par divers mécanismes dont la transrepression du facteur NF- $\kappa$ B (Lawrence et Natoli 2011). L'expression de PPAR- $\gamma$  est induite dans les macrophages par l'action d'IL-4 et IL-13 (Ricote et al. 1998). La délétion de PPAR $\gamma$  dans des macrophages, entraîne une diminution de 50 à 70% de la capacité à éliminer les ACs. L'efférocytose entraîne l'expression de PPAR $\gamma$  et de LXRs qui permettent ensemble un switch de polarisation vers un état M2 (Chawla 2010). PPAR $\gamma$  et LXR permettent la détection et l'élimination des ACs. PPAR $\gamma$  par son effet positif sur l'élimination des ACs, place l'efférocytose en faveur des macrophages M2 (Chawla 2010). Cependant l'élimination des cellules nécrotiques (inflammatoires) ou l'élimination des cellules opsonisées semble ne pas être influencée par l'absence ou la présence de PPAR $\gamma$ . Ce qui suggère que l'efférocytose, n'est qu'une des façons que possèdent les macrophages, pour éliminer les débris cellulaires, ou autres pathogènes (Pastore et al. 2016; M. A. Gray 2016). Ce qui sous-entend que la phagocytose, et l'élimination du matériel dans le phagosome sont des mécanismes à la fois présents chez les M1, et les M2. Toutefois les FdT qui les régulent sont eux, certainement différents.

**STAT6:** est un FdT induit par IL-4 et IL-13. STAT6, est déclenché par la voie de l'IL-4 et augmente l'expression d'IRF4. L'absence d'IRF4 diminue le profil M2 des macrophages (Satoh et al. 2010). (Tugal, Liao, et Jain 2013). L'IL-4 et l'IL-13 induisent la polarisation M2 et celle-ci passe par l'axe JAK-STAT6 (Lawrence et Natoli 2011). STAT6 régule l'expression de plusieurs gènes M2 comme *Arg1*, le récepteur au mannose (*Mrc1* ou CD206), *Fizz* (aussi connu comme *Retnla*) et (Lawrence et Natoli 2011). Il existe aussi un lien d'exclusion mutuelle entre STAT6 et STAT1 dans la polarisation des macrophages et le phénotype M1 et M2. STAT6 est retrouvé associé à PGC1 $\beta$  dans la publication de Vast et collègue, de 2006. Dans cette étude publiée dans "Cell Metabolism" ils démontrent, dans des macrophages, qu'une polarisation M2 (induite par l'IL-4) entraîne une activation des gènes réponses dépendants du couple de FdT STAT6/PGC1 $\beta$ . Cette activation génique permet d'induire la FAO et la mitochondriogenèse ainsi qu'une diminution du phénotype M1 (Vats et al. 2006).

**Les GCR** pour récepteurs aux glucocorticoïdes. Il existe 2 isoformes ( $GCR\alpha$  et  $GCR\beta$ ). Les glucocorticoïdes libérés par les glandes surrénales en réponse à divers stress, comme la douleur, le jeûne, et les variations de température (Tugal, Liao, et Jain 2013). En condition physiologique, les GCs circulent de façon circadienne et participent au maintien des fonctions homéostatiques (Tugal, Liao, et Jain 2013). Les M2c sont induits en réponse aux GCs et sont impliqués dans l'efférocytose, la cicatrisation et la résolution de l'inflammation (Martinez et Gordon 2014). Le traitement aux GCs chez l'Homme, limite les dommages tissulaires et augmente la phagocytose des débris cellulaires. Ce résultat est confirmé par la publication d'Ehrlich et collègues. On traitement aux GCs sur des macrophages différenciés à partir de sang de donateurs volontaires a permis de démontrer que les macrophages ont une surexpression des marqueurs anti-inflammatoires (IL-4, IL-10) associés à une diminution des gènes inflammatoires (IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$ ). L'activation des R-GC inhibe la voie du TLR4 en inhibant NF $\kappa$ B afin d'inhiber les signaux inflammatoires. Dans le cas de NF $\kappa$ B, les R-GC actifs se lient à p65 ce qui empêche la formation du complexe NF $\kappa$ B-IRF3 (Ogawa et al. 2006). *In vitro* sur des cellules J774 (macrophages, monocytes), les auteurs montrent que l'hydrocortisone entraîne une inhibition de la production du NO (produit par l'iNOS) dans les macrophages, en réponse au LPS (Rosa et Moncada 1990).



**Figure 40 : Les signaux et régulation des facteurs de transcription dans la polarisation des macrophages M1 et M2.** Les voies de polarisation des M1 et M2, commencent par la détection d'un stimulus. Ce signal va entraîner l'activation de FdT séquence spécifique qui va entraîner des modifications du transcriptome. Les gènes les plus caractéristiques de la polarisation M1 et M2 sont représentés. Illustration adaptée de la publication de Toby Lawrence (Marseille, France) (Lawrence et Natoli 2011) Ajay Chawla (Stanford -USA) (Chawla 2010), Noelia A-Gonzalez (Las Palmas-Espagne) (A-Gonzalez et al. 2010) Cynthia Hong (Los-Angeles - USA) (Hong, s. d.).

La polarisation des macrophages dépend de signaux de l'environnement et de la transduction de ce dernier jusqu'à activé un FdT, du métabolisme cellulaire et de la dynamique et paysage chromatinien.

L'ARN polymérase II (Pol II) transcrit l'ADN en ARNm avec l'aide de divers facteurs. La transcription est divisée en 3 phases, l'initiation (reconnaissance et la liaison de la Pol II au promoteur du gène) puis l'élongation qui est la phase de synthèse de l'ARNm et enfin la terminaison qui consiste en la libération de l'ARNm transcrit par la Pol II. La régulation de l'expression génique est essentielle pour avec une fonction cellulaire physiologique. La Chromatine, qui permet la compaction de l'ADN, régule aussi son accessibilité. La dynamique des nucléosomes (un octamère d'histones composé de deux fois :H2A, H2B, H3 et H4) et leurs échanges permet de déstabiliser leur liaison à l'ADN. Les FdT dans le noyau se lient à leur site sur des séquences dépourvues de nucléosomes. Néanmoins une part non négligeable de la dynamique chromatinienne et donc de la régulation de la transcription est due aux protéines non-histones présentes dans le noyau (Glozak et al. 2005). Parmi ces protéines non histones, soumises aux modifications post-traductionnelle des HAT et HDAC, on retrouve les fdTs eux-mêmes comme STAT3, p53 ou HIF1 $\alpha$ , mais aussi d'autres protéines comme la famille HMG (Glozak et al. 2005).

## G. HMG (HMG Protéines et sa famille)

### I. Structure de la super famille des protéines d'HMG

Les protéines HMG (High Mobility Group) sont des protéines nucléaires non histones de faible poids moléculaire (10-30 kDa) découvertes dans les années 1970. Leur nom vient du fait qu'elles possèdent 50% d'acides aminés chargés, ce qui leur confère une grande mobilité électrophorétique (Goodwin, Sanders, et Johns 1973). Les protéines HMG regroupent différentes superfamilles : HMGA, HMGN et HMGB

#### 1. HMGBA (A/T hook Motif)

La famille des High Mobility Group protein A (HMGA) (Lund et al. 1983) comporte 4 membres : **HMGA1(a, b, c)** et **HMGA2**. L'expression de ces deux gènes est principalement embryonnaire, puis diminue au cours de la maturation des tissus. Les protéines HMGA possèdent 3 domaines « A-T hook ». Ces motifs chargés positivement (Pro-Arg-Gly-Arg-Pro) lui confèrent la capacité d'interagir de façon « conformation dépendante » avec le petit sillon de l'hélice d'ADN. L'état de phosphorylation de résidus sérine ou thréonine est un moyen d'influencer l'affinité de sa liaison à l'ADN. Lorsque HMGA est phosphorylée il devient anionique et son affinité de liaison à l'ADN diminue. Au contraire, une hypophosphorylation augmente l'affinité d'HMGA pour l'ADN (Diana et al. 2001).

Rôle des protéines HMGA1 dans la constitution de « l'enhanceosome » : il s'agit du complexe d'assemblage des éléments *cis* régulateurs, qui entraînent les modifications locales de la chromatine enfin de recruter l'ARN polymérase II au promoteur d'un gène. La formation ou la destruction de l'enhanceosome est en partie régulée par l'acétylation de deux lysines d'HMGA1 : l'acétylation de la lysine 71, associée à la formation de l'enhanceosome, et l'acétylation de la lysine 65, associée à la destruction du complexe nucléoprotéique. Les HMGA peuvent donc être considérées comme des coactivateurs pangénomiques de la transcription.

#### 2. HMGN (Nucleosomale Binding Domain (NBD))

La superfamille des High Mobility Group N (HMGN) présente uniquement chez les vertébrés se compose de 6 membres : **HMGN1**, **HMGN2**, **HMGN3 (a, b)**, **HMGN4** et **HMGN5**. Les **HMGN** sont exprimés dans les tissus embryonnaires et les cellules souches (Crippa, Nickol, et Bustin 1991) ; (Furusawa et al. 2006; Lehtonen et Lehtonen 2001; Kugler et al. 2013). Ils présentent deux NLS (Nuclear Localization Signal), un NBD (Nucleosome Binding Domain), et un RD (Regulatory domain) chargé négativement présent en C-Terminal. Leur principale fonction est de participer à la structure de la chromatine en se liant au nucléosome via leur NBD. Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine, chaque nucléosome est constitué de 147 paires de base d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones contenant deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4. En fonction des modifications post-traductionnelles qu'ils présentent, ils participent à l'état de compaction ou décompaction de la chromatine. HMGN favorise l'ouverture de la chromatine donc la transcription et/ou la traduction HMGN est considéré comme un coactivateur translationnel pangénomique. La liaison HMGN : nucléosome est régulée par des modifications post-traductionnelles. L'acétylation d'HMGN sur les résidus lysine diminue son affinité au nucléosome. De la même façon, la phosphorylation des résidus des sérines de la NDB, induit une relocalisation d'HMGN du noyau vers le cytoplasme.

### 3. HMGB (MBG-box)

#### 3.1 HMGB2, HMGB3, HMGB4

Les High Mobility Group Box protéines (HMGB) sont composés de 4 membres : **HMGB (1, 2, 3 et 4)** Tous les HMGB présentent au moins 2 motifs “HMG Box” de liaison à l’ADN appelé Box-A et Box-B. Chacun de ces domaines se lie à l’ADN sans reconnaître de séquence précise.

HMGB1, 2, 3 présentent une queue acide en C-Terminal alors qu’HMGB4 n’en possède pas (J. O. Thomas et Travers 2001). Cette partie acide peut servir d’ancrage à diverses protéines nucléaires. De toutes les protéines HMGB, c’est la protéine HMGB1 qui présente suite à sa délétion complète le phénotype le plus marqué parmi toutes les HMG.

### III. HMGB1

Elle est la protéine non histone la plus abondante du noyau. Dans les cellules mammifères HMGB1 représente 10<sup>6</sup> molécules par noyau. La séquence de cette protéine est conservée au cours de l’évolution. Elle présente 100% d’homologie entre la souris et le rat, et 99% d’homologie entre la souris et l’Homme (Ferrari et al. 1994; Gariboldi et al., s. d.). HMGB1 est extrêmement mobile, elle s’exporte du noyau vers le cytoplasme en moins de deux secondes (Phair et al. 2004; Sapojnikova et al. 2005). Divers articles suggèrent qu’HMGB1 peut aussi aller dans la mitochondrie (Stumbo et al. 2008; Kang et al. 2011) (sans pour autant avoir de signal d’adressage à la mitochondrie), ou encore dans le lysosome (Gardella et al. 2002). HMGB1 est essentiel pour la survie. En effet, les animaux présentant une délétion constitutive et totale du gène *Hmgb1* (*Hmgb1*<sup>-/-</sup>) ont un phénotype létal dû, notamment, à une sévère hypoglycémie post-natale (Calogero et al. 1999).

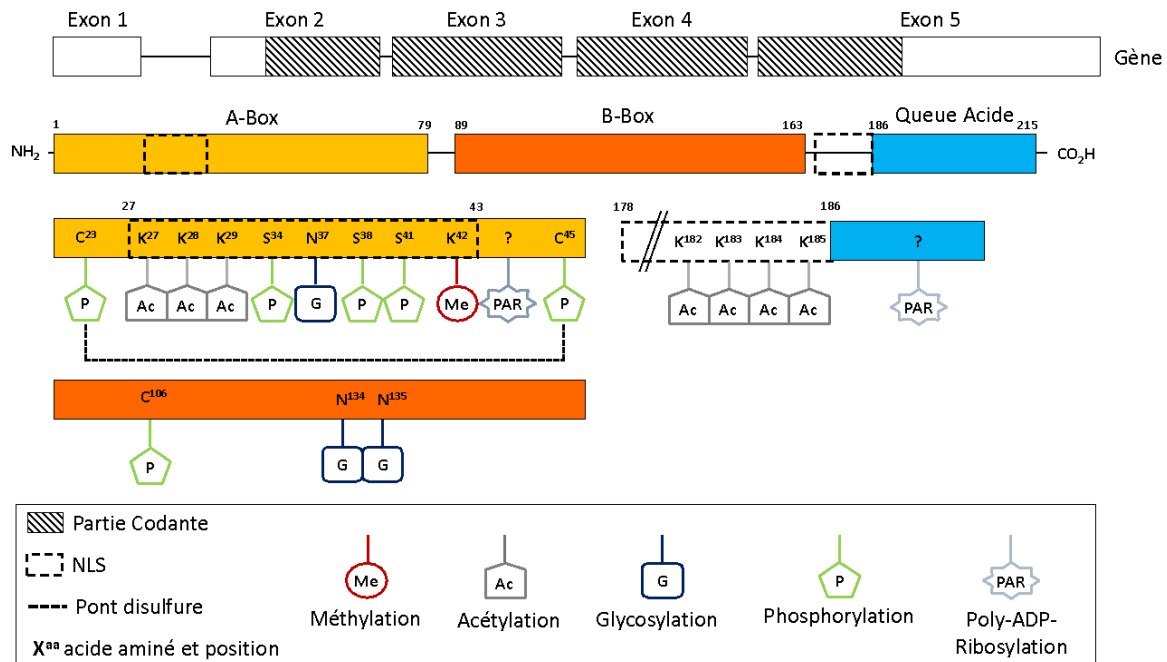
#### 1. La structure moléculaire

Grâce à ses deux sites de liaison à l’ADN de 80 acides aminés : les boîtes HMG (ou HMG Box) A et B. HMGB1 comportent deux séquences de nucléarisation (NLS) riches en lysines localisées entre les acides aminés 28 à 44 (NLS1) et 179 à 185 (NLS2). La partie C-terminale de la protéine est composée d’une queue acide mobile de 30 acides aminés, principalement composée d’acides aspartique et glutamique. HMGB1 présente aussi une NES (Nucléaire Export Signal) dont la séquence exacte n’est pas encore identifiée mais est située dans les box A et B.

En plus de sa fonction nucléaire HMGB1 joue un rôle prépondérant au niveau extracellulaire dans l’inflammation et l’immunité. L’exportation d’HMGB1 hors de noyau se fait par diverses modifications post-traductionnelles.



## 2. Les modifications post-traductionnelles d'HMGB1



**Figure 41 : Bilan des modifications post-traductionnelles d'HMGB1.** HMGB1 est codée par les exons 2, 3, 4 et 5. Les modifications post traductionnelles sont majoritairement situées dans la A-Box et en amont de la queue acide. Le pont disulfure formé entre les cytosines 23 et 45 permet l'interaction d'HMGB1 avec le TLR4.

### 2.1. La méthylation

A ce jour, une unique méthylation a été décrite. Le site de méthylation se situe dans la NLS1 au niveau de la Lysine 42. Dans les neutrophiles, cette lysine est monoéthylène (Ito, Fukazawa, et Yoshida 2007) et cette modification entraîne une relocalisation de la protéine vers le noyau. Le transport se fait par diffusion passive au travers des pores nucléaires grâce au petit poids moléculaire d'HMGB1 (25 KDa).

### 2.2. La phosphorylation

Lors de l'activation de cellules immunes par le TNF- $\alpha$ , HMGB1 est phosphorylée au niveau de la NLS1 ce qui inhibe l'interaction entre HMGB1 et l'importine KAP- $\alpha$ 1 (Youn et Shin 2006) permettant une relocalisation cytoplasmique et à terme une orientation vers les voies sécrétoires. La phosphorylation se fait sur trois résidus sérine localisés dans la NLS1 : les serines 34, 38 et 41 *via* l'action de la PKC. Quand les cystéines 23 et 45 sont phosphorylées, elles forment un pont disulfure autour de la NLS1, sans impacter la localisation cellulaire de HMGB1 (Venereau et al. 2012). En revanche, la phosphorylation de la cystéine 106, située dans la box-B entraîne une relocalisation cytoplasmique de HMGB1 (Venereau et al. 2012).

### 2.3. La glycolysation et l'ADP-ribosylation

HMGB1 possède trois asparagines glycosylables en position 37, 134 et 135. Cette glycosylation constitue un prérequis pour sa sécrétion suite à un stimulus pro-inflammatoire. De plus, cette modification post-traductionnelle protège HMGB1 de la dégradation par le protéasome. La Poly(ADP)-ribosylation (PAR) de HMGB1 est médiée par la Poly(ADP)-ribose Polymerase-1 (PARP-1) (Ditsworth, Zong, et Thompson 2007). L'action de cette enzyme se fait sur des résidus à ce jour inconnus mais probablement situés dans la boîte HMG-A et la queue acide. Cette modification relocalise HMGB1 dans le cytoplasme et rejoint les voies de sécrétion.

### 2.4. L'acétylation

En réponse à l'acétylation des lysines, HMGB1 est transloqué du noyau vers le cytoplasme pour être sécrété. Cette modification post-traductionnelle se fait sur des résidus lysine particuliers, localisés proche des NLS : les lysines 27, 28 et 29 (proches de la NLS1) et les lysines 182, 183, 184, 185 (proches de la NLS 2). Les modifications se font principalement par les histones-acétyl transférase CBP, PCAF et p300 (Bonaldi 2003) sous le contrôle de la voie JAK/STAT 1. Ces acétylations sont éliminées par les désacétylases SIRTUIN1 (Rabadi et al. 2015) et HDAC1/HDAC4 (Evankovich et al. 2010). Les nombreuses modifications post traductionnelles vont permettre d'orienter HMGB1 vers la voie sécrétoire. Une fois dans le milieu extracellulaire, HMGB1 joue principalement un rôle de médiateur de l'inflammation.

## 3. Le rôle nucléaire

En physiopathologie HMGB1 nucléaire participe à plusieurs processus.

### **HMGB1 régule la recombinaison V(D) J :**

Il s'agit d'une recombinaison site-spécifique permettant de créer une grande diversité de T-Cell Receptor (TCR) et d'immunoglobulines (Ig) et cette recombinaison se fait par les recombinases RAG (Recombination Activating Gene). Bien que les RAG soient suffisantes pour induire la recombinaison, HMGB1 est nécessaire pour stabiliser le complexe RAG:ADN (Little et al. 2013).

### **HMGB1 régule la traduction :**

Il permet la décompaction de la chromatine : HMGB1 peut déstabiliser le nucléosome. En effet, il existe une interaction entre la queue acide d'HMGB1 et la partie N-Terminal de l'histone H3 (Watson et al. 2014), cette interaction va entraîner l'ouverture de la chromatine et la déstabilisation du nucléosome. En cas d'inhibition de l'expression d'HMGB1, l'activité transcriptionnelle du récepteur aux œstrogènes est drastiquement diminuée (Joshi et al. 2012). Dans ce cas précis, HMGB1 joue le rôle de coactivateur spécifique de la transcription.

### **HMGB1 régule la liaison des facteurs de transcription :**

Il permet aux récepteurs nucléaires tels que les récepteurs à NFκB, SREBP et p53 de se lier à leur site sur l'ADN. HMGB1 pourrait interagir directement avec SREBP1 et SREBP2 et augmenterait leur activité transcriptionnelle (Najima et al. 2005). HMGB1 pourrait interagir aussi avec la protéine p53, dans ce cas, leur interaction inhibe l'adressage de p53 vers le noyau ce qui empêche l'expression de ses gènes cibles (Livesey et al., s. d., 201). Mais une fois dans le noyau HMGB1 peut aussi directement faciliter l'interaction entre p53 et l'ADN en modifiant l'organisation spatiale des sites de liaison de p53 (McKinney et Prives 2002). HMGB1 a donc un effet opposé sur la transcription dépendante de p53 en fonction du lieu, où ce couple de protéines se retrouve.

### **HMGB1 régule la stabilité génomique :**

Chez les mammifères, la stabilité du génome est notamment assurée par la présence de télomères à l'extrémité des chromosomes. Ces séquences sont synthétisées par la télomérase. Dans un modèle de MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) *Hmgb1*<sup>-/-</sup> l'instabilité génomique est augmentée et l'activité de la télomérase est divisée par 3 (Polanská et al. 2012). Lors de dommages à l'ADN, HMGB1 participe à la modification et réparation de la chromatine. Son absence dans des MEFs *Hmgb1*<sup>-/-</sup> sensibilise ces dernières à l'irradiation (Lange, Mitchell, et Vasquez 2008). Dans un contexte physiopathologique suite à une endotoxémie les pro-monocytes (THP-1) humains subissent un remodelage de leur chromatine par le binôme HMGB1 :H1 afin de réprimer l'expression du gène de TNF-α (El Gazzar et al. 2009).

## **4. Le rôle cytoplasmique et extracellulaire**

En 1979, lors de l'utilisation d'anticorps spécifiques d'HMGB1, Michael Bustin et Natasha Neihart rapportent un marquage positif dans le cytoplasme (Bustin et Neihart 1979). Cette étude suggère pour la première fois un possible rôle extranucléaire pour HMGB1. Merenmies et collaborateurs identifient en 1991 un premier rôle cytoplasmique d'HMGB1 (Merenmies et al. 1991). Depuis, la littérature scientifique sur HMGB1 continue de mettre en lumière de nouveaux rôles intra- et extracellulaire.

### **4.1. La sécrétion d'HMGB1**

HMGB1 est libéré dans le milieu extracellulaire de différentes façons.

**Une sécrétion passive :** HMGB1 est libéré dans le milieu extracellulaire lorsqu'il y a lésion cellulaire. Lors d'un événement nécrotique, l'intégrité de la membrane plasmique des cellules est altérée. Le contenu nucléo-cytoplasmique est alors déversé hors de la cellule. A ce moment-là, HMGB1 est un signal d'activation pour le système immunitaire inné, et joue le rôle de DAMPS (Scaffidi, Misteli, et Bianchi 2002).

**Une sécrétion active :** HMGB1 est activement sécrété par les cellules immunes activées. En effet, suite à une stimulation (LPS, TNF-α ou IL-1) les cellules immunes s'activent et finissent par sécréter de façon tardive HMGB1. Il est un acteur tardif de la réponse immunitaire innée : la sécrétion de HMGB1 *in vivo* atteint son maximum 15 heures après l'induction d'un choc septique par le LPS (Ulf Andersson et Tracey 2011; L. Yang et al. 2014; Lu et al. 2012; Yanai et al. 2013; Gunasekaran et al. 2013). La libération de HMGB1 est tardive par rapport aux autres cytokines comme le TNF-α et IL-1

qui sont augmentées au cours de deux premières heures (H. Yang et Tracey 2010). HMGB1 dans le milieu extracellulaire (DAMPs) stimule la synthèse de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 sans entraîner d'augmentation d'IL-10 dans les monocytes du sang humain (U. Andersson et al. 2000). N'ayant pas de séquence signal permettant sa sécrétion HMGB1 est sécrété par une voie non canonique : la voie des lysosomes sécrétoires (Gardella et al. 2002). Il s'agit de vésicules sécrétoires issues du réseau trans golgien. Elles sont principalement retrouvées dans les macrophages et ostéoclastes.

La fusion de ces particules avec la membrane plasmique permet l'exocytose, ce mécanisme est régulé par les flux intracellulaires de calcium.

La sécrétion de HMGB1 se fait donc en deux temps :

**1/ Export du noyau au golgi :** Par acétylation de résidus au niveau de la NLS1 et NLS2 de HMGB1 (Lu et al. 2014, 1). En fonction de son statut d'acétylation, on peut déterminer la voie de sécrétion utilisée. Une hyper-acétylation signera une sécrétion par les cellules immunes activées après un challenge inflammatoire.

**2/ Transport du golgi à la membrane plasmique :** La sécrétion active de HMGB1 a longtemps été considérée comme exclusive aux cellules immunitaires. Cependant, suite à une stimulation au TNF- $\alpha$ , une lignée cellulaire d'adipocytes murins en culture (3T3-L1) sécrète activement HMGB1 de façon dose dépendante *via* un mécanisme impliquant la voie des JNK (Shimizu et al. 2016). Une étude clinique montre que HMGB1 (DAMPs) est libéré après une ischémie/reperfusion du foie (van Golen et al. 2019). L'étude montre que grâce à un agent antioxydant (MitoQ) ils parviennent à diminuer de 50% la libération de HMGB1 corrélé à une diminution de la nécrose hépatique et de la production de cytokines foie (van Golen et al. 2019).

#### 4.2. HMGB1 active les cellules immunitaires

Une fois dans l'espace extracellulaire, HMGB1 va pouvoir activer les cellules inflammatoires innées, notamment les macrophages (U. Andersson et al. 2000) et les neutrophiles (Tadie et al. 2013) en se liant sur des récepteurs classiques de l'immunité. De plus, HMGB1 mature les DCs en un phénotype inflammatoire, identique à celui induit par les lymphocytes Th1, ceci via son domaine HMG Box B (Messmer et al. 2004). La libération HMGB1 est retrouvée dans plusieurs maladies, comme celle de l'intestin irritable (Zhu et al. 2015).

**RAGE :** pour "Receptor for Advanced Glycosylation End-products" est un récepteur membranaire de 35 kDa appartenant à la famille des immunoglobulines. La partie C terminale se compose d'une partie intracellulaire responsable de l'activation du FdT NF $\kappa$ B, dans les cellules immunes, par un mécanisme RAS-p38 MAPK dépendent. RAGE peut lier des ligands très divers tels que les produits de glycation avancés (AGE), HMGB1 (Kokkola et al. 2005) ou des alarmines de type S100A et S100B. Une forme soluble de RAGE existe, due à un épissage alternatif de l'ARN messager, on parle alors de Soluble RAGE (sRAGE) (Sárkány et al. 2011). Ce récepteur soluble permettrait de bloquer l'interaction entre RAGE et ses ligands, en particulier HMGB1, inhibant ainsi l'activation des cellules immunes (J. Zhang et al. 2017).

**TLR4 :** pour "Toll Like Receptor 4" appartient à la super famille des TLR. En 1997, Medzhitov et ses collaborateurs identifient le TLR4 chez l'Homme, puis en 1999 le ligand prototypique est identifié : il s'agit du LPS bactérien (Medzhitov et Janeway, Jr 2000). Depuis, une vingtaine de ligands ont été identifiés et notamment HMGB1. Suite à son activation le TLR4 va induire deux types de réponses :

- 1/ Une réponse précoce, Myd88-NF $\kappa$ B dépendant, conduisant à la production de TNF- $\alpha$ .
- 2/ Une réponse tardive, TRIF-IRF3 dépendant, conduisant à la production d'IFN $\gamma$ .

Lors d'une infection bactérienne, la liaison entre HMGB1 et le TLR4 des neutrophiles provoque la NETs (Neutrophils Extracellular Traps). La formation de ces filets d'ADN est sous la dépendance du TLR4. Ainsi, l'apparition des NETs peut être médiée par le LPS ou HMGB1 (Brinkmann 2004).

**TLR9** : Le "Toll Like Receptor 9" découvert en 2000 lie les îlots CpG (Cytosine - Phosphate - Guanine) de l'ADN (Hemmi et al. 2000). La reconnaissance d'îlots CpG par le TLR9 signe soit une nécrose cellulaire, soit une infection bactérienne. La voie de signalisation du TLR9 passe par NFκB et aboutit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF-α. Dans l'espace extracellulaire, HMGB1 est lié aux îlots CpG de l'ADN nucléaire et sa présence potentialise la liaison de l'ADN sur le TLR9 ainsi que la production de cytokines par les macrophages (J. Tian et al. 2007). L'activation de TLR9 induit la sécrétion active de HMGB1 par les cellules dendritiques ou les macrophages.

Dans leur étude, Tian *et al.* rapportent que les effets intracellulaires de la détection des îlots CpG sont médiés par une coopération entre le TLR9 et RAGE (J. Tian et al. 2007). Les études montrent une action synergique des récepteurs TLR4 et RAGE dans l'induction de la réponse immunitaire. Tout se passe comme si HMGB1 servait à activer de multiples récepteurs de l'immunité en réponse à un stimulus unique, potentialisant ainsi la réponse immunitaire induite. Dans ce modèle, HMGB1 est une protéine « scaffold » extracellulaire.

#### 4.3. HMGB1 fait partie du SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype)

Lorsqu'une cellule entre en sénescence, elle libère activement HMGB1 de son noyau. Il se retrouve alors dans le cytoplasme, où il sera alors pris en charge pour être sécrété. La perte d'HMGB1 dans le noyau entraîne des modifications de la conformation chromatinienne à la base du programme transcriptionnel de sénescence chez des HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) (Sofiadis et al. 2019). Au cours de la sénescence, il est montré que le nombre de nucléosomes diminue (Celona et al. 2011). Il est alors émis comme hypothèse qu'HMGB1 participe à l'assemblage du nucléosome et à leur maintien. Dans des MEFs *Hmgb1*<sup>-/-</sup>-Celona et collègues ont observé une diminution accentuée du nombre de nucléosomes au cours du temps par rapport à des MEFs WT diminue (Celona et al. 2011). La diminution du nombre de nucléosomes augmente la sensibilité de l'ADN face aux dommages, et altère l'expression relative de 10% du génome diminue (Celona et al. 2011). Les cellules sans HMGB1 sont plus sensibles à l'ionisation par radiation.

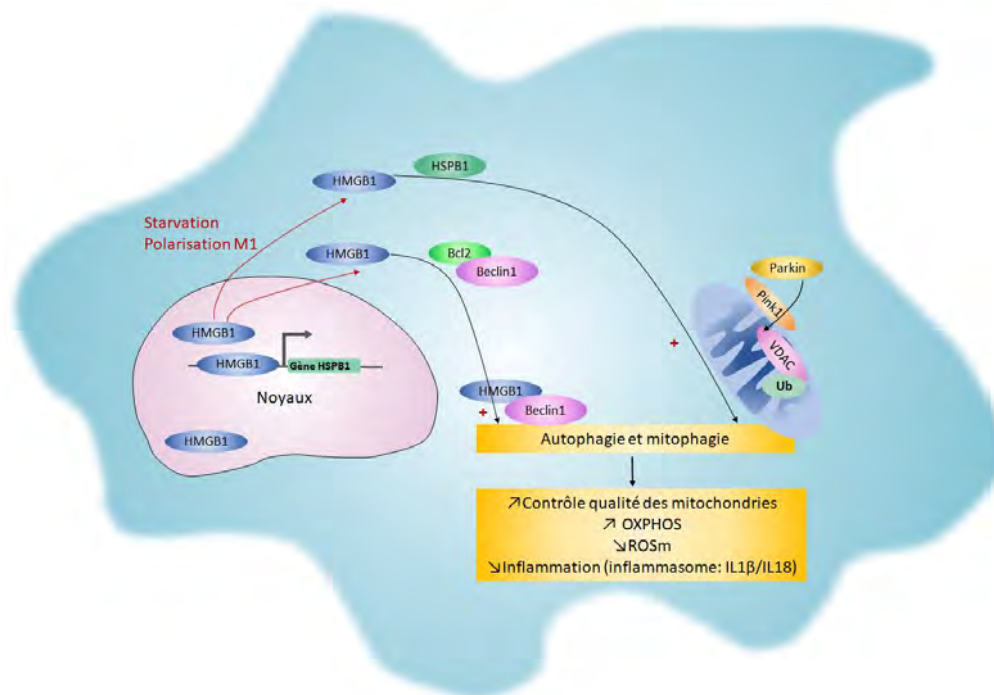
#### 4.4. HMGB1 et son rôle dans l'autophagie/mitophagie

Tang et collaborateurs ont mis en évidence un rôle d'HMGB1 dans l'autophagie (D. Tang et al. 2010). Lors d'un stress dans des lignées de cellules tumorales, HMGB1 subit un export nucléocytoplasmique. Une fois dans le cytoplasme, HMGB1 participe à la dissociation du complexe inhibiteur de l'autophagie BCL2:Beclin-I et promeut la mitophagie et autophagie (Daolin Tang et al. 2011; Y. Tang et al. 2016). Cette promotion de l'autophagie protège la cellule contre l'accumulation de mitochondries altérées, et prévient de la surproduction de ROSm (Pickles, Vigié, et Youle 2018; Kang et al. 2011). La régulation de la mitophagie par HMGB1 serait aussi due à son rôle positif dans la transcription du gène codant pour la protéine Heat Shock Protein beta-1 (HSPB1). HSPB1 interagit avec le cytosquelette d'actine et participe à la constitution des vésicules de l'autophagie. La perte de l'une de ces deux protéines dans des MEFs induit phénotype identique, caractérisé par un réseau mitochondrial fragmenté et des OXPHOS diminuées (Kang et al. 2011). Ainsi dans ce modèle *in-vitro*, HSPB1 et HMGB1 régulent le contrôle qualité des mitochondries (Daolin Tang et al. 2011) (**Voir figure 39**).

Des publications montrent qu'un défaut d'autophagie dans les macrophages (LC3B<sup>-/-</sup> ou Beclin 1<sup>-/-</sup> ou Atg16<sup>-/-</sup>) induit une augmentation des sécrétions des inflammatoires dépendantes de l'inflammasome (IL-1β et IL-18) en réponse au LPS (Daolin Tang et al. 2011) (Kang et al. 2011). L'accumulation de

mitochondries altérées (dû à un défaut d'autophagie) provoque l'activation de l'inflammasome. Les KO (LC3B<sup>-/-</sup> ou Beclin 1<sup>-/-</sup> ou Atg16<sup>-/-</sup>) dans le macrophage sensibilisent les animaux face aux chocs septiques (Nakahira et al. 2011). Pink1 (Mitophagy PTEN-induced putative kinase-1) est une kinase localisée à la membrane externe de la mitochondrie. Lors de la dépolarisation de la membrane mitochondriale, Pink1 adresse Parkin (initialement dans le cytoplasme) dans la mitochondrie. Une fois à l'intérieur, Parkin entraîne l'ubiquitination de VDAC 1 (voltage dependent anion channel 1) qui est alors reconnu par p62 (adaptateur de l'autophagie). La protéine p26 se lie alors à LC3 (light chain 3) qui permet la formation de l'autophagosome autour de la mitochondrie. Kang et ses collègues montrent qu'HMGB1 et HSPB1 régule la translocation de Parkin, et l'ubiquitination de VDAC 1 lors de la dépolarisation de la membrane mitochondriale. Les auteurs précisent qu'HMGB1 et HSPB1 transloquent dans la mitochondrie lors d'un stress cellulaire, sans pour autant confirmer qu'elles interagissent physiquement avec Pink1/Parkin (Kang et al. 2011). Dans des MEFs HMGB1<sup>-/-</sup> diminue les OXPHOS, ceci est associée à un réseau mitochondrial fragmenté, à une diminution de la protéine Opa1 (optic atrophy 1) (Kang et al. 2011).

Cependant, il existe une controverse sur le rôle d'HMGB1 et l'autophagie. Huebener et collaborateurs n'ont pas retrouvé ce rôle de contrôle qualité des mitochondries *in vivo*, en utilisant un KO spécifique des hépatocytes et un autre KO spécifique des cardiomyocytes (Huebener et al. 2014). Cette différence de résultats pourrait en partie s'expliquer par la stratégie utilisée pour réaliser les délétions d'HMGB1. En effet, même si les deux groupes ont utilisé la technologie CRE-Lox pour réaliser la délétion, Tang et collaborateurs ont mis en place une stratégie reposant sur le floxage des exons 2 et 3 alors que Huebener et collaborateurs ont réalisés le floxage des exons 2, 3 et 4. Ces résultats contradictoires ont conduit certains auteurs à proposer l'existence de deux autophagies : l'une indépendante et l'autre dépendante d'HMGB1 (Huebener et al. 2014) ; (Sun et Tang 2014)



**Figure 42 : Rôles d'HMGB1 sur l'autophagie et mitophagie.** Dans le noyau HMGB1 participe à l'expression de HSPB1. Lors d'un stress cellulaire HMGB1 quitte le noyau, et les mitochondries subissent une dépolarisation de leur membrane. Dans le cytoplasme HMGB1, active d'une part l'autophagie en libérant Beclin 1 de son partenaire inhibiteur Bcl 2, et d'autre part la mitophagie en association avec HSPB1 de façon Parking/pink1 dépendante. Ensemble ces deux voies permettent une élimination des mitochondries altérées, ce qui améliore les OXPHOS et diminue l'inflammation dépendante de l'activation de l'inflammasome. Illustration synthétique des articles de Michael T. Lotze and Daolin Tang (Pittsburgh-USA) (Daolin Tang et al. 2011; Kang et al. 2011).

#### 4.5. HMGB1 et son rôle dans le macrophage

Dans la publication de Wang et collaborateurs parue en 2020, les auteurs démontrent qu'après une ischémie, les neurones de rat transloquent HMGB1 de leurs noyaux vers les mitochondries (où il colocalise avec DRP1). HMGB1 a aussi été retrouvé adressé aux peroxyosomes (car HMGB1 colocalise avec Catalase) (D. Wang et al. 2020, 1). Néanmoins HMGB1 ne colocalise pas avec Rab5/Rab7 (protéines retrouvées sur les endosomes) ni avec LC3A/B (protéines retrouvées sur les phagosome) et enfin, HMGB1 ne colocalise pas avec LAMP1 (qui est retrouvée sur les lysosome) (D. Wang et al. 2020, 1). La translocation d'HMGB1 dans la mitochondrie est aussi retrouvée dans les cellules HUVECs suite à leur infection par l'agent pathogène *Toxoplasma gondii* (HMGB1 colocalise avec le signal de mitotracker) (Stumbo et al. 2008).

Métaboliquement, il a été rapporté une interaction entre HMGB1 et PKM2 (enzyme limitante de la glycolyse). Cette interaction est décrite comme bloquant les OXPHOS et entraînant une mort cellulaire unique. Celle-ci est due à la formation d'une géante mitochondrie, qui diminue la synthèse d'ATP dans des cellules tumorales du colon (G. Gdynia et al. 2010; Georg Gdynia et al. 2016). Toujours en lien avec PKM2, Yang et collaborateurs ont mis en évidence au cours d'endotoxémie que la libération d'HMGB1 est également induite par la voie de la glycolyse aérobie (Effet Warburg du M1) qui fait intervenir PKM2-HIF1 $\alpha$  dans des macrophages RAW 264.7 (L. Yang et al. 2014). Dans cet article, les auteurs expliquent que PKM2 interagit et stabilise HIF1 $\alpha$ . De par sa stabilisation HIF1 $\alpha$  entre dans le noyau, ce qui est associé à une sortie d'HMGB1 du noyau, puis hors de la cellule. L'utilisation de Shikonine (Inhibiteur de l'enzyme PKM2), entraîne une diminution de sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'HMGB1, mais aussi une diminution de l'activité de HIF1 $\alpha$ . Globalement, l'usage de Shikonine sur ces macrophages diminue l'effet Warburg (preuve d'une polarisation M1). Ce dernier semble être défini par les auteurs comme une augmentation de la glycolyse, de la production de lactate, de la stabilisation de HIF1 $\alpha$ , de la libération d'IL-1 $\beta$  et d'HMGB1 (L. Yang et al. 2014). L'inhibition de PKM2 protège les souris de la mort dans les conditions d'endotoxémie et de sepsis (L. Yang et al. 2014). Cependant la façon dont il est possible de relier l'activation de glycolyse aérobie et la sécrétion d'HMGB1 reste inconnue.

D'autres auteurs semblent apporter une explication sur la façon dont il serait possible de relier l'effet Warburg (M1) et la sécrétion active de HMGB1. En effet dans des macrophages, lors de la polarisation M1, HMGB1 est relocalisé dans le cytoplasme puis vers le milieu extracellulaire (Ulf Andersson et Tracey 2011) ; (L. Yang et al. 2014) ; (Lu et al. 2012); (Yanai et al. 2013). Cette sortie du noyau est permise par une hyperacétylation des deux NLS d'HMGB1 dépendante de l'activité de STAT1 (FdT M1) (Lu et al. 2012). Il est intéressant de relever que toutes les polarisations des macrophages n'entraînent pas la sécrétion d'HMGB1 dans le milieu extracellulaire. En effet les macrophages M2 (M2a et les M2c) ne sécrètent pas ou peu d'HMGB1, par rapport au M1 qui libèrent 15 fois plus d'HMGB1 dans le milieu de culture (Lolmede et al. 2009). Cette libération active d'HMGB1 est retrouvée dans d'autres cellules stressées. Des adipocytes en culture avec du LPS libèrent activement et de façon tardive (entre 12 et 24 heures) HMGB1 dans leur cytoplasme et le milieu extracellulaire (Gunasekaran et al. 2013; D. Wang et al. 2020).

#### 4.6. HMGB1 protège d'une sur-inflammation lors d'une infection bactérienne

Toutefois, le fait que lors de la polarisation M1, HMGB1 se retrouve dans le cytoplasme, n'est pas forcément associé à de mauvais pronostics vitaux. En effet, suite à une infection par *Listeria Monocytogenes* ou une endotoxémie induite par le LPS, les souris avec une délétion d'HMGB1 spécifiquement dans les macrophages sont plus sensibles que les souris WT. Ces résultats laissent supposer un rôle anti-inflammatoire d'HMGB1 dans les macrophages. En effet, dans cette cellule l'absence d'HMGB1 est associée à une diminution de l'autophagie pouvant expliquer la sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires et une mort cellulaire précoce des macrophages pouvant être responsable de la sensibilité accrue à l'infection bactérienne ou au choc septique (Yanai et al. 2013). Dans cet article, les auteurs n'étudient pas précisément la localisation subcellulaire d'HMGB1, lors de l'infection chez les animaux WT, ils confirment simplement qu'HMGB1 est retrouvé dans le cytoplasme du macrophage M1. Néanmoins, ils ne reproduisent pas *in vitro* la mort des macrophages lors de la reconnaissance du LPS. Cette mort des macrophages était décrite comme étant l'élément déclencheur de la létalité des animaux. Mais plusieurs modifications dans la physiologie du macrophage entraînent la sortie du noyau d'HMGB1. En effet, l'efférocytose réalisée par les macrophages induit une relocalisation d'HMGB1 du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (Banerjee et al. 2011).

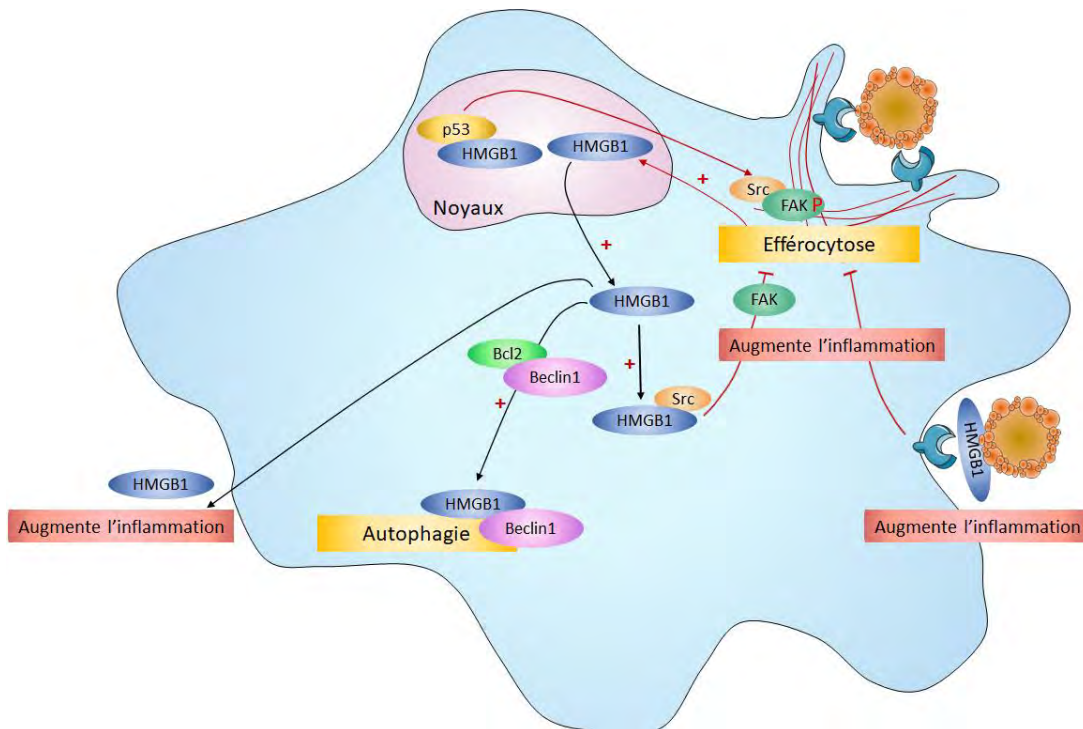
#### 4.7. HMGB1 et la phagocytose dans le macrophage

Dans le noyau HMGB1 augmente la phagocytose des macrophages via son interaction avec p53 (Miao et al. 2020). Par son interaction, il diminue le rôle négatif de p53 sur la phosphorylation de FAK ce qui montre qu'HMGB1 nucléaire régule positivement la phagocytose des macrophages (Miao et al. 2020).

Dans le cytosol HMGB1 diminue la phagocytose *in vivo*. Il s'associe alors à la kinase Src. Cette liaison (HMGB1-Src) diminue la disponibilité de Src et ainsi sa liaison activatrice à FAK. Ce qui a pour conséquence de diminuer la phosphorylation de FAK et donc sa capacité à promouvoir la phagocytose (Miao et al. 2020) ; (Banerjee et al. 2011). En effet, la phosphorylation de FAK favorise la formation de pseudopodes et augmente la capacité à phagocyter des macrophages (Miao et al. 2020). Les auteurs montrent qu'HMGB1 cytosolique dans les macrophages diminue la phagocytose (Banerjee et al. 2011). (Miao et al. 2020). A l'inverse, lors d'un sepsis induit par l'agent infectieux *Ehrlichia*, il y a une translocation d'HMGB1 dans le cytosol entraînant l'autophagie (Kader et al. 2021). Cette dernière dans le cas d'une infection par *Ehrlichia*, va apporter les nutriments nécessaires pour la croissance du pathogène (Kader et al. 2021). Dans ce cas, la translocation d'HMGB1 dans le cytosol entraîne l'autophagie, qui sera détournée par le pathogène afin de permettre sa croissance.

Dans le milieu extracellulaire, HMGB1 s'associe aux phosphatidylsérines des ACs et inhibe l'efférocytose de ces dernières par les macrophages (Banerjee et al. 2010; Friggeri et al. 2010; G. Liu et al. 2009); (Banerjee et al. 2011). Ceci démontre qu'HMGB1 extracellulaire diminue l'efférocytose des macrophages. Ce qui, par ailleurs, est connu pour augmenter l'inflammation (Schaper et al. 2016).





**Figure 43 : Rôles d'HMGB1 dans l'efférocytose :** HMGB1 en fonction de sa localisation sub-cellulaire, influence différemment l'efférocytose. Dans le noyau il favorise l'activité de FAK, qui améliore donc la dynamique de remodelage sous-jacent aux lamellipodes, afin de réaliser l'efférocytose. L'efférocytose entraîne un transport nucléo-cytoplasmique d'HMGB1. Une fois dans le cytosol, il dissocie la kinase activatrice Src, de FAK, ce qui diminue l'activité de FAK, et diminue l'efférocytose. Une fois hors de la cellule, HMGB1 se lie aux phosphatidylsérines et diminue leur reconnaissance par les récepteurs de l'efférocytose. Illustration synthétique des articles de Sami Banerjee (Birmingham- USA) (Banerjee et al. 2011). Jifei Miao (Guangdong, Chine) (Miao et al. 2020). et Darlynn Korns (Denver-USA) (Korns et al. 2011).

#### 4.8. Physiopathologie de l'axe HMGB1-Phagocytose

La diminution de l'efférocytose est un événement important dans la physiopathologie du LSE (Lupus Érythémateux Systémique) (Schaper et al. 2016). En effet, cette diminution entraîne l'accumulation de cellules nécrotiques et la libération d'HMGB1 (qui une fois dans le milieu extracellulaire diminue l'efférocytose (Banerjee et al. 2010)). L'équipe de Johanna Westra s'est posé la question de l'effet d'HMGB1 sur la polarisation des macrophages et sur leur capacité de phagocytose, dans un cadre du LES. Ils ont découvert et publié que les monocytes circulants, du sang des patient SLE, présentent un phénotype M1 plus important (moins de CD163 (marqueur M2) et autant de CD68 (marqueur M1)) que les monocytes des patients saints (Schaper et al. 2016). *In vitro* après différenciation des monocytes en macrophage, ils ont découvert qu'il n'y a pas de différence dans la plasticité des macrophages à devenir M1, ou M2, chez les patients SLE et les patients saints. Ceci souligne que le défaut d'efférocytose observé chez les SLE est dépendant du milieu extracellulaire, et n'est pas autonome à la cellule (Schaper et al. 2016). *In vitro* avec HMGB1, ils ont observé lors de la différenciation M2, une up régulation des taux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , ceci associé à une diminution de l'activité de phagocytose macrophages (Schaper et al. 2016). Résultats confirmés par la diminution de l'activité d'efférocytose (des jurkat apoptotiques) des macrophages *in vitro* en présence d'HMGB1 dans le milieu (Schaper et al. 2016). Les monocytes des patients SLE présentent un phénotype M1 plus important que les patients saints. HMGB1 altère la polarisation M2 et favorise la polarisation vers le phénotype M1, ceci associé à la réduction de l'efférocytose.

Ces effets négatifs d'HMGB1 sur l'activité d'efférocytose a aussi été détaillée par l'équipe d'Edward Abraham dans sa publication en 2008 (G. Liu et al. 2008). Ils démontrent que HMGB1 inhibe la phagocytose des neurones apoptotiques par sa liaison avec la phosphatidylsérine (PS) et la reconnaissance de ce complexe par TLR4 et RAGE en favorisant une polarisation M1 (G. Liu et al. 2008). D'autres équipes ont aussi relevé le rôle délétère de HMGB1 extracellulaire, dans le cadre

d'infection. C'est le cas de l'équipe de Matthew D. Neal qui a montré que la libération de HMGB1 (DAMPs) dans le milieu par les cellules myéloïdes diminue la clairance des bactéries (*E. Coli*) par les phagocytes, ce qui prédispose les animaux à des septicémies (Zettel et al. 2017). Dans la publication de Zettel et collègues, les auteurs n'identifient pas le récepteur et le mécanisme par lequel HMGB1 diminue l'efférocytose. D'autres publications prouvent d'autres mécanismes par lesquels HMGB1 inhibe l'efférocytose. C'est le cas de la publication de Friggeri et de ses collègues en 2010 dans laquelle ils illustrent qu'HMGB1 interfère avec la phagocytose en se liant aux intégrines  $\alpha\beta3$  (Friggeri et al. 2010).

Les différents auteurs tirent les conclusions suivantes : HMGB1 extracellulaire retarde l'efférocytose de divers types cellulaires *in vitro* et *in vivo* ce qui contribue à la pathologie qu'elle soit inflammatoire (SLE) ou infectieuse (*E. Coli*) (Schaper et al. 2016) ; (G. Liu et al. 2008);(Zettel et al. 2017). De plus, ceci montre que le phénotype des monocytes et macrophages est déterminé par l'environnement, notamment par la présence d'HMGB1 dans le milieu extracellulaire (Schaper et al. 2016); (G. Liu et al. 2008) ; (Zettel et al. 2017).

## **OBJECTIF DE THÈSE**

Comme évoqué en introduction, les mécanismes qui permettent de réguler la réponse inflammatoire sont complexes et leur dysfonction fait le lit des maladies inflammatoires chroniques ou des sepsis. Face au manque de thérapies efficaces, il est nécessaire d'identifier de nouveaux mécanismes de régulation du statut inflammatoire des cellules myéloïdes, notamment des macrophages, au cours de ces maladies. Le facteur nucléaire HMGB1 semble, au vu de la bibliographie, être un acteur important du statut inflammatoire des cellules myéloïdes, et plusieurs aspects de ses rôles cellulaires sont encore inconnus. HMGB1 est une protéine aux rôles pléiotropes avec des rôles identifiés en fonction de sa localisation sub cellulaire et extracellulaire. Dans le noyau, il régit la conformation de la chromatine et module ainsi la transcription génique. Par des modifications post-transcriptionnelles (reflets de modifications métaboliques) HMGB1 peut quitter le noyau et agir dans le cytoplasme de la cellule. Enfin, par la voie de sécrétion du lysosome, HMGB1 est sécrété activement hors de la cellule, où il agit comme alarmine en se liant à RAGE ou TLR (4 et 9). Une fois libéré, HMGB1 entraîne l'activation des macrophages, des DCs et des neutrophiles qui synthétisent à leur tour des cytokines inflammatoires, ce qui amplifie la réponse inflammatoire le plus souvent pathologique. C'est dans ce large champ d'action que j'ai réalisé ma thèse de science, qui s'intitule :

### **L'Étude des rôles du facteur nucléaire HMGB1 dérivé des macrophages.**

Pour réaliser cette étude, il a été mis en place dans notre équipe un modèle de souris transgénique, qui présente une délétion du gène *Hmgb1* spécifiquement dans les lignées myéloïdes. Cette souris possède dans la séquence du gène codant pour HMGB1 deux sites LoxP présents de part et d'autre des exons 2, 3 et 4. De plus, ce modèle possède l'expression de la CRE recombinase, sous le contrôle du promoteur *Lyz2* (*LysM* pour Lysozyme M). Ce qui permet l'expression de la CRE et l'excision des exons 2, 3 et 4 du gène HMGB1 précisément dans les cellules qui expriment le lysozyme M (Macrophages, DC, monocytes, neutrophiles). Ce modèle transgénique est donc homozygote pour le gène codant pour HMGB1 contenant les séquences LoxP (HMGB1<sup>Flox</sup>) et hétérozygote pour le CRE. On distingue les animaux CRE<sup>-/-</sup> (HMGB1<sup>Flox</sup>) et les animaux CRE<sup>-/+</sup> (HMGB1<sup>ΔMac</sup>). A l'aide de ce modèle et pour répondre à la problématique de ma thèse, j'ai d'abord identifié deux objectifs :

#### **PREMIER OBJECTIF DE THÈSE :**

##### **Étudier le rôle d'HMGB1 dérivé des macrophages et de ses conséquences sur la survenue de la fibrose.**

Cette partie de l'étude se portera sur le rôle d'HMGB1 dérivé des macrophages et de ses conséquences sur la survenue de la fibrose. Une fois dans la circulation sanguine HMGB1 est considéré comme une alarmine, qui va amplifier l'inflammation. Il semblerait de plus qu'HMGB1 extracellulaire diminuerait l'efficacité de l'efférocytose (Banerjee et al. 2010, 10; Friggeri et al. 2010). Dans les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> en l'absence d'HMGB1 lorsque les macrophages s'activeront suite à la détection d'une lésion tissulaire, ils seront dans l'incapacité de promouvoir l'inflammation médiée par la libération active de leur propre HMGB1. Ainsi, l'intensité de l'inflammation devrait être moins importante chez les animaux mutants (HMGB1<sup>ΔMac</sup>) par rapport aux animaux WT (HMGB1<sup>Flox</sup>). Si la réponse inflammatoire est amoindrie, les lésions tissulaires liées à cette dernière seront elles aussi amoindries. Ceci entraînera lors de la phase de régénération une accumulation moins importante de matrice extracellulaire. Dans ce contexte, nous posons l'hypothèse qu'HMGB1 dérivé des macrophages pourrait influencer la survenue de la fibrose lors de lésions chroniques.

## **DEUXIÈME OBJECTIF DE THÈSE :**

### **Étudier le rôle intracellulaire d'HMGB1 dérivé des macrophages au cours du choc inflammatoire aigu**

Cette partie de l'étude prendra en compte les rôles nucléaires et cytoplasmiques d'HMGB1 dans le macrophage. Une étude récente met en évidence que les dérégulations de l'inflammation sont à la base d'environ 50% des décès enregistrés chaque année dans le monde (Furman et al. 2019). Cette publication souligne l'urgence de trouver de nouveaux acteurs pour endiguer une sur-inflammation. Cette répression de l'inflammation implique divers FdT, ainsi que la dynamique chromatinienne. Le facteur nucléaire HMGB1 régule l'expression génique et participe à la dynamique chromatinienne. Dans le noyau HMGB1 interagit avec p53 (Kang et al. 2014; Livesey et al., s. d.). Cette interaction influence la phagocytose (Miao et al. 2020) l'autophagie et l'apoptose (Livesey et al., s. d.) ; (Daolin Tang et al. 2011), l'effet Warburg qui est propre aux M1 (L. Yang et al. 2014). HMGB1 dans la cellule influence la chromatine ainsi que les mécanismes en lien avec l'autophagie et la phagocytose. La phagocytose et l'autophagie dans les macrophages influencent la respiration mitochondriale, qui constitue un levier pour jouer sur l'orientation des macrophages et réguler l'amplitude de la réponse inflammatoire (Bossche et al. 2012; Viaud et al. 2019; S. Zhang et al. 2019). Dans ce contexte, nous posons l'hypothèse qu'HMGB1 exprimée dans les macrophages pourrait réguler, via la respiration mitochondriale, la polarisation des macrophages et par conséquent l'amplitude de la réponse inflammatoire.

## RÉSULTATS

### **PREMIER OBJECTIF DE THÈSE :**

**Étudier le rôle d'alarmine d'HMGB1 dérivé des macrophages et de ses conséquences sur la survenue de la fibrose.**

**Mise en contexte :** En condition physiologique HMGB1 a une localisation nucléaire. Dans le cas du macrophage, lors d'une activation suite à la détection d'un signal inflammatoire (DAMPs, PAMPs, LAMPs) HMGB1 est acétylé au niveau de ses NLS et quitte le noyau. Dans le cytoplasme, il est alors pris en charge par la voie de sécrétion des lysosomes pour être sécrété hors du milieu, où il entraîne une amplification du signal inflammatoire (Kang et al. 2014). Comme les cytokines inflammatoires canoniques (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ), la protéine HMGB1 ainsi que d'autres sont retrouvées en grande quantité dans le sang, lors d'une inflammation. Ce cocktail de cytokines et alarmines orchestre la réponse inflammatoire et la survenue de la fibrose (Weiskirchen, Weiskirchen, et Tacke 2018). Des données dans la littérature soulignent le fait qu'elles puissent participer et favoriser la cicatrisation et la fibrogenèse (W. Zhang et al. 2015).

Étudier les effets de la déplétion d'HMGB1 spécifiquement dans les macrophages permet de répondre à la question : Quelle est la contribution d'HMGB1 issu des macrophages, dans l'induction de la fibrose ?

## RESEARCH ARTICLE

# Macrophage-derived HMGB1 is dispensable for tissue fibrogenesis

Jean Personnaz<sup>1</sup> | Enzo Piccolo<sup>1</sup> | Maxime Branchereau<sup>1</sup> | Aveline Filliol<sup>2</sup> |  
Romain Paccoud<sup>1</sup> | Elsa Moreau<sup>1</sup> | Denis Calise<sup>3</sup> | Elodie Riant<sup>1</sup> |  
Pierre Gourdy<sup>1,4</sup> | Christophe Heymes<sup>1</sup> | Robert F. Schwabe<sup>2</sup> | Cédric Dray<sup>1</sup> |  
Philippe Valet<sup>1</sup> | Jean-Philippe Pradère<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, UMR 1048/I2MC, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Toulouse, Toulouse, France

<sup>2</sup>Department of Medicine, Columbia University, New York, New York

<sup>3</sup>UMS006, Université de Toulouse, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1048, Institute of Cardiovascular and Metabolic Disease, Toulouse, France

<sup>4</sup>Service de Diabétologie, Maladies Métaboliques et Nutrition, CHU de Toulouse, Toulouse, France

## Correspondence

Jean-Philippe Pradère, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM-Université Paul Sabatier UMR 1048, Toulouse, France.  
Email: jean-philippe.pradere@inserm.fr

## Funding information

INSERM, Paul Sabatier University; Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-17-CE14-0016; Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité; Paul Sabatier University; Agence Nationale de la Recherche; Région Midi-Pyrénées-INSERM, Grant/Award Number: 15050341

## Abstract

Alarmins and damage-associated molecular patterns (DAMPs) are powerful inflammatory mediators, capable of initiating and maintaining sterile inflammation during acute or chronic tissue injury. Recent evidence suggests that alarmins/DAMPs may also trigger tissue regeneration and repair, suggesting a potential contribution to tissue fibrogenesis. High mobility group B1 (HMGB1), a bona fide alarmin/DAMP, may be released passively by necrotic cells or actively secreted by innate immune cells. Macrophages can release large amounts of HMGB1 and play a key role in wound healing and regeneration processes. Here, we hypothesized that macrophages may be a key source of HMGB1 and thereby contribute to wound healing and fibrogenesis. Surprisingly, cell-specific deletion approaches, demonstrated that macrophage-derived HMGB1 is not involved in tissue fibrogenesis in multiple organs with different underlying pathologies. Compared to control HMGB1<sup>Flox</sup> mice, mice with macrophage-specific HMGB1 deletion (HMGB1<sup>ΔMac</sup>) do not display any modification of fibrogenesis in the liver after CCL<sub>4</sub> or thioacetamide treatment and bile

**Abbreviations:** Acta2, alpha actin2; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; BDL, bile duct ligation; BW, body weight; CCL<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; Col1a1, type1 alpha1 collagen; Col1a2, type1 alpha2 collagen; Col3a1, type3 alpha1 collagen; DAMPS, damage-associated molecular patterns; DNA, deoxyribonucleic acid; Emr1, EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 1; FS, fractional shortening; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HMGB1, high mobility group box 1; HW/TL, heart weight to tibia length ratio; IL-18, interleukin 18; IL-1β, interleukin 1β; LPS, lipopolysaccharide; LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVESD, left ventricular end-systolic dimension; PCR, polymerase chain reaction; PRR, pattern recognition receptor; RAGE, receptor for advanced glycation end products; TAA, thioacetamide; TAC, transverse aortic constriction; TLR, toll-like receptor; TNFα, tumor necrosis factor α; UUO, unilateral ureteral obstruction; α-SMA, α-smooth muscle actin.

Jean Personnaz and Enzo Piccolo contribute equally.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2018 The Authors.

duct ligation; in the kidney following unilateral ureter obstruction; and in the heart after transverse aortic constriction. Of note, even under thermoneutral housing, known to exacerbate inflammation and fibrosis features, HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice do not show impairment of fibrogenesis. In conclusion, our study clearly establishes that macrophage-derived HMGB1 does not contribute to tissue repair and fibrogenesis.

#### KEYWORDS

alarmin, DAMP, fibrosis, innate immunity

## 1 | INTRODUCTION

Sterile inflammation and regeneration are two biological processes that are tightly related to wound healing, but if uncontrolled could lead to scarring and fibrotic responses, contributing to the long term to organ loss of function.<sup>1,2</sup> Among cells involved in the modulation of these crucial functions, several types of macrophages play a central role in the clearance of dying/dead cells, and promote tissue repair by secreting a broad variety of molecules, such as cytokines, chemokines, or alarmins,<sup>1-4</sup> that either maintain the inflammation process and/or activate tissue myofibroblasts in charge of synthesizing extracellular matrix components to promote tissue architecture restoration.<sup>2,5</sup> Globally in the context of wound healing, immunostimulatory molecules originating either from macrophages (alarmins) or dying cells (such as damage-associated molecular patterns [DAMPs]) have been characterized as both pro-inflammatory but also as pro-regenerating agents involved in progenitor cell proliferation and differentiation,<sup>1,3,4</sup> thus potentially involve during chronic tissue injury, in inflammation and fibrosis processes which are now supported by several reports in the heart and lungs.<sup>6,7</sup> Among pro-inflammatory and pro-repair agents secreted by macrophages, high mobility group box 1 (HMGB1), also known for its alarmin and DAMP properties, has drawn a lot of attention as it is considered as an attractive target to treat acute and chronic inflammatory diseases<sup>8-10</sup> and is also envisioned as a relevant biomarker of tissue injury<sup>11,12</sup> in humans. HMGB1 can reach the extracellular space, once released by necrotic epithelial cells and exerts its DAMPs function or when secreted by activated innate immune cells, where it mediates potent inflammatory effects.<sup>10,13</sup> Macrophages and other innate immune cells actively secrete HMGB1 upon an inflammatory challenge (interleukin 1β [IL1β], lipopolysaccharide [LPS], or tumor necrosis factor α [TNFα]) in vitro and in vivo<sup>14-17</sup> supporting a possible role of macrophage-derived HMGB1 in tissue scarring. Recent publications documented a critical role of extracellular HMGB1 in regeneration and tissue repair processes in bone, muscle, or liver<sup>18-21</sup> suggesting a

potential role in tissue fibrogenesis. Moreover, HMGB1 has been proposed to play a direct role in promoting fibrosis in the liver, lungs, kidney, and heart through different pathways such as inflammation or myofibroblast activation.<sup>22-24</sup> However, in liver fibrosis, hepatocyte-derived HMGB1 is likely not involved in fibrogenesis as shown in recent studies,<sup>19,20</sup> excluding any potential role of HMGB1 as a DAMP in liver scarring progression implying that non-parenchymal cells, such as macrophages, could be the cellular source of HMGB1 during tissue fibrosis development.

To determine whether macrophage-derived HMGB1 has a determinant role in fibrosis progression, we evaluated the impact of a macrophage-specific HMGB1 genetic deletion on the liver, kidney, and cardiac fibrosis. Using very well-established fibrosis models in three different organs, our anatomic-pathological explorations revealed that unexpectedly, macrophage-derived HMGB1 has no major role in fibrogenesis in mice.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animals

All experimental procedures were performed in accordance with institutional guidelines for animal studies and are approved by the Ethics Committee (US006 CREFRE - CEEA-122, 1710480320). Myeloid-specific deletion of HMGB1 (HMGB1<sup>ΔMac</sup>) were generated crossing LysM-CRE<sup>+/-</sup> (a generous gift from a gift from Dr Pierre Gourdy, Toulouse France) with HMGB1<sup>Flox</sup> mice (a generous gift from Dr Robert F. Schwabe, Columbia University, NY), littermates LysM-CRE<sup>-/-</sup> HMGB1<sup>Flox/Flox</sup> (HMGB1<sup>Flox</sup>) were used as control. After randomization, 8 to 12-week-old male mice were used in this study. Mice were housed under specific pathogen-free conditions at 20-22°C and 50%-60% humidity, with a 12 hour light/dark cycle and free access to water and food. For thermoneutrality studies, mice were housed at 30°C in a Noroit A-Box (Noroit, Bouaye, France). Before running any experiments, mice were usually placed at 30°C for a 2-week period of acclimation. At the time of sacrifice, tissues



and organs were dissected, weighted and directly snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for gene expression and western blot analyses. For histological analysis, tissues were fixed in 10% formalin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

## 2.2 | Genotyping

DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) were performed using Kapa mouse genotyping kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA) according to the manufacturer protocol. PCR reactions were performed using following primers: LysM-CRE: 5'-ACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAG-3' (forward) and 5'-AGTGC GTT CGAACGCTAGAGC-3' (reverse), LoxP1 5'-TAAGAGCTGGGTAACTTTAGGTG-3' (forward) and 5'-GAAACAGACAAGCTTCAAAGCTGCT-3' (reverse), LoxP2 5'-TGACAGGATACCCAGTGTTAGGGG-3' (forward) and 5'-CCAGAGTTTAATCCACAGAA GAAA-3' (reverse). Deletion PCR was performed using LoxP1 forward and LoxP2 reverse primers.

## 2.3 | Murine models of fibrosis

Liver chemically induced fibrosis was triggered by intraperitoneal injection (ip) of carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ , 02671, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 0.5  $\mu\text{L/g}$  in corn oil, at a ratio of 1:3) for eight injections or by ip of thioacetamide (TAA, 163678, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in NaCl 0.9% for 6 weeks (three injections per week) at increasing concentrations (first dose: 50 mg/kg, second dose: 100 mg/kg, third to sixth dose: 200 mg/kg, all following doses: 300 mg/kg) as previously described.<sup>25</sup> Cholestatic-induced liver fibrosis was induced in 8-week-old male mice by ligating the common bile duct for 21 days, as described.<sup>26</sup> Kidney fibrosis was induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) on 8-week-old mice. UUO was performed by ligating the ureter just below the renal pelvis for 7 days, as previously described.<sup>27</sup> Transverse aortic constriction (TAC) was performed on 8 to 12-week-old male mice for 28 days. After anesthesia, the transverse aorta was isolated and TAC was performed by tying a waxed braided silk suture, to induce pressure overload and cardiac hypertrophy as previously described.<sup>28</sup> For all surgical procedures, sham-operated animals underwent the same operation except the suturing of inner organs.

## 2.4 | Cardiac function assessment

The left ventricle dimensions were determined using echocardiography and (Time/Motion) mode acquisition from the parasternal short axis view at the level of the papillary muscles using a Vivid7 echograph and a 14 MHz transducer (i3L, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Images were transferred and analyzed offline with EchoPAC (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

## 2.5 | Hepatic stellate cell isolation

Hepatic stellate cells were isolated from mice as described previously.<sup>25</sup> Briefly, after cannulation of the inferior vena cava, the portal vein was cut, allowing retrograde step-wise perfusion with pronase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and collagenase (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland) containing solutions, and subsequent 9.7% Nycodenz gradient centrifugation. Purity was assessed by vitamin A autofluorescence under a fluorescent microscope (Olympus 71IX). After 5 hours in dulbecco modified eagle medium (DMEM) 10% fetal calf serum (FCS), 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco, Grand Island, NY, United States) and 0.1% Gentamicin (Gibco, Grand Island, NY, United States), stellate cells have been cultured with 1/1.74 diluted bone marrow-derived macrophages (BMDM) conditioned media in DMEM 0.1% FBS for 24 hours.

## 2.6 | Plasma analysis

Aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels were determined in plasma by the Phenotype-CREFRE facility using a Pentra400 biochemical analyzer (HORIBA Medical, Kyoto, Japan). HMGB1 circulating levels were assessed by ELISA (ST51011; IBL International, Hamburg, Germany) according to the manufacturer guidelines.

## 2.7 | Bone marrow-derived macrophages

Bone marrow cells were obtained by flushing the cavity of femurs and tibia of HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> mice (8 week old) in sterile DMEM F12 supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were filtered on a 42  $\mu\text{m}$  cell-strainer, and after erythrocyte lysis, harvested cells are plated and treated with 10 ng/mL recombinant murine macrophage colony stimulating factor (M-CSF) (PeproTech, Inc, Rocky Hill, NJ, USA) for 7 days. The medium was renewed every 2 days with DMEM 10% FCS with 10 ng/mL M-CSF. Then, BMDM were treated with 10 ng/mL of LPS (055:B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1 hour and 30 minutes, then washed two times to remove LPS using phosphate buffered saline (PBS), and conditioned media were generated in DMEM 0.1% FCS during 48 hours.

## 2.8 | Immunocytofluorescence

Bone marrow-derived macrophages were fixed after 7 days of differentiation, with 10% formalin. Cells were permeabilized with 0.1% Triton and stained with a primary antibody against HMGB1 (1:200, ab18256; Abcam, Cambridge, UK) and Alexa Fluor 546-conjugated secondary antibody (1:800, A11010; Life



Technologies, Carlsbad, CA, USA). Nuclei were stained with DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Confocal microscopy was performed on an LSM 780 confocal laser microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) using a 63× oil immersion lens.

## 2.9 | Stromal vascular fraction preparation

Mice were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg), then perfused with PBS to wash out blood from tissues. Mice were euthanized and tissues were harvested. Liver and lungs were digested with collagenase D (2.5 mg/mL; Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland) under agitation for 20 minutes at 37°C. After centrifugation at 600 g for 10 minutes, stromal cells were separated in 30% percoll (GE Healthcare, 17-0891-01, Upsale, Sweden). After centrifugation at 600 g for 15 minutes, the pellet containing stromal cells were incubated with erythrocyte lysis buffer for 10 minutes followed by another centrifugation (600 g, 10 minutes) and resuspension in PBS.

## 2.10 | Western blotting

Tissues were homogenized in RIPA buffer (TRIS 20 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, TRITON X100 1%, Tetra-Sodium Pyrophosphate 2.5 mmol/L, B-Glycerophosphate 1 mmol/L, Sodium orthovanadate 1 mmol/L) containing proteases and phosphatases inhibitors (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) using Precellys sample lyzer (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, France). Western blots were performed using standard procedures using antibodies against HMGB1 (1:1000, ab18256; Abcam, Cambridge, UK) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (1:1000, ab5694; Abcam, Cambridge, UK). GAPDH (1:2000, ab181602; Abcam, Cambridge, UK), was used as a loading control.

## 2.11 | Gene expression

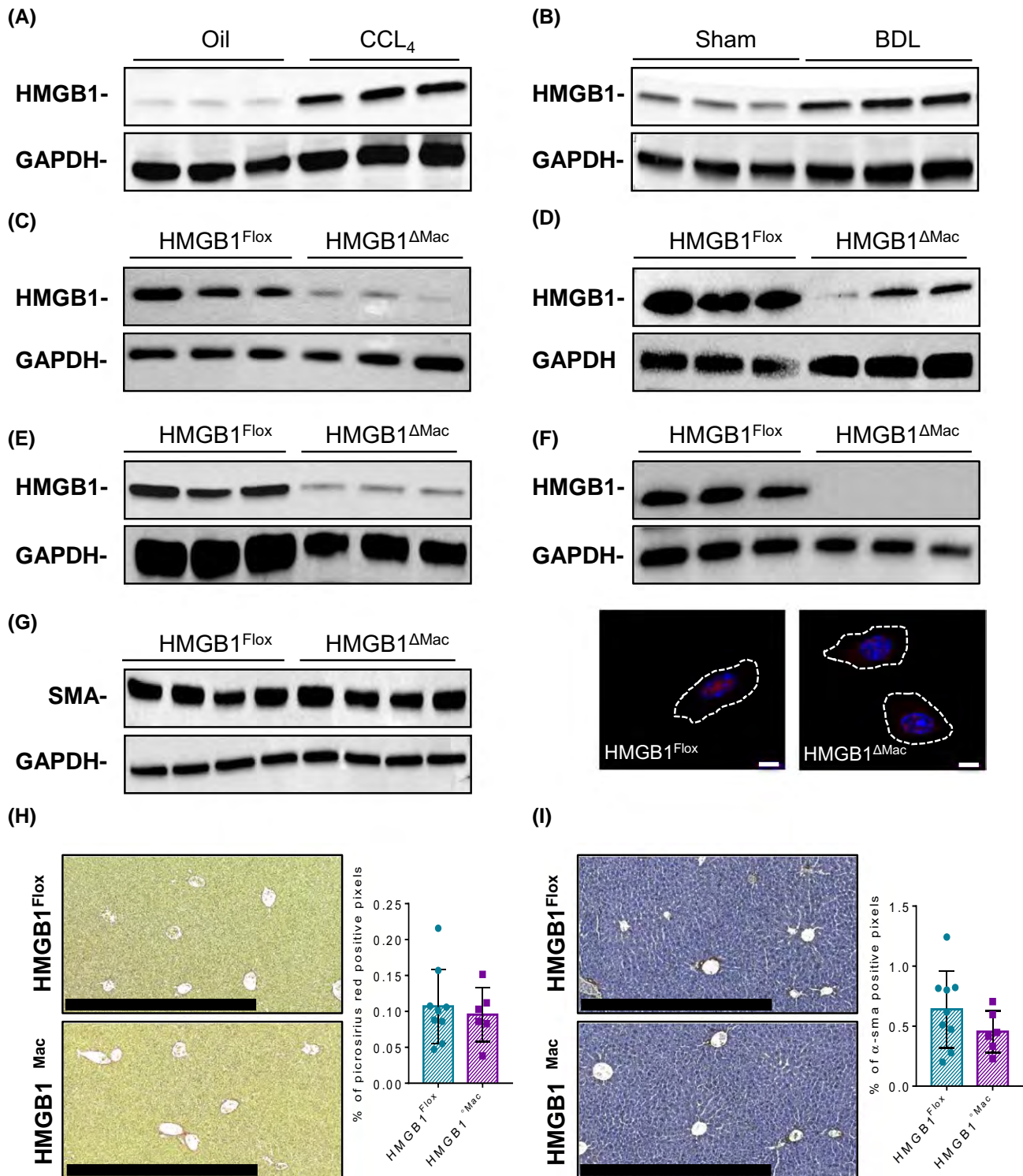
RNA was extracted using GenJET RNA purification kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) and DNase treatment (Qiagen, Hilden, Germany). After dosage with Xpose

(Trinean, Gentbrugge, Belgium), reverse transcription was performed using High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer protocol. Real-Time-qPCR (RT-qPCR) was performed with indicated primer pairs gene expression is normalized using *Rplp0* reference gene expression. Primer sequences were as follows: *Acta2*, 5'-GTCCCAGACATCAGGGAGTAA-3' (forward) and 5'-TCGGATACTTCAGCGTCAGGA-3' (reverse), *Colla1*, 5'-TGTGTGCGATGACGTGCAAT-3' (forward) and 5'-GGGTCCCTCGACTCCTACA-3' (reverse), *Col3a1*, 5'-AAGGCGAATTCAAGGCTGAA-3' (forward) and 5'-TGTGTTTGTAGTACAGCCATCCTCTAGAA-3' (reverse), *Emr1*, 5'-TGACAACCAGACGGCTTGTG-3' (forward) and 5'-GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT-3' (reverse), *Rplp0*, 5'-AGTCGGAGGAATCAGATGACGAT-3' (forward) and 5'-GGCTGACTTGGTTGCTTTGG-3' (reverse), *Tnfa* 5'-TGGGACAGTGACCTGGACTGT-3' (forward) and 5'-TTCGGAAAGCCATTTGAGT-3' (reverse), *Il6*, 5'-GCCCACCAAGAACGATAGTCA-3' (forward) and 5'-CAAGAAGGCAACTGGATGGAA-3' (reverse), *Il1 $\beta$* , 5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCGATG-3' (forward) and 5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3' (reverse), *Ccn2*, 5'-GGCATCTCCACCCGAGTTAC-3' (forward) and 5'-GATTTTGGTGTCCGGATGCA-3' (reverse). For *Colla1*, *Colla2*, and *Acta2* mRNA expression displayed in Figure S4, RNA were extracted using High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics, Risch-Rotkreuz, Switzerland) and qPCR analysis was conducted using Taqman-primer probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## 2.12 | Histology and immunohistochemistry

10% formalin-fixed samples were paraffin embedded and sliced at 5  $\mu$ m. For picosirius red staining, sections were dipped for 1.5 hours in picric acid containing 1% direct red 80 (365548; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.5% fast green (F7258; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Immunohistochemistry was performed using anti-mouse  $\alpha$ -SMA (ab5694; Abcam,

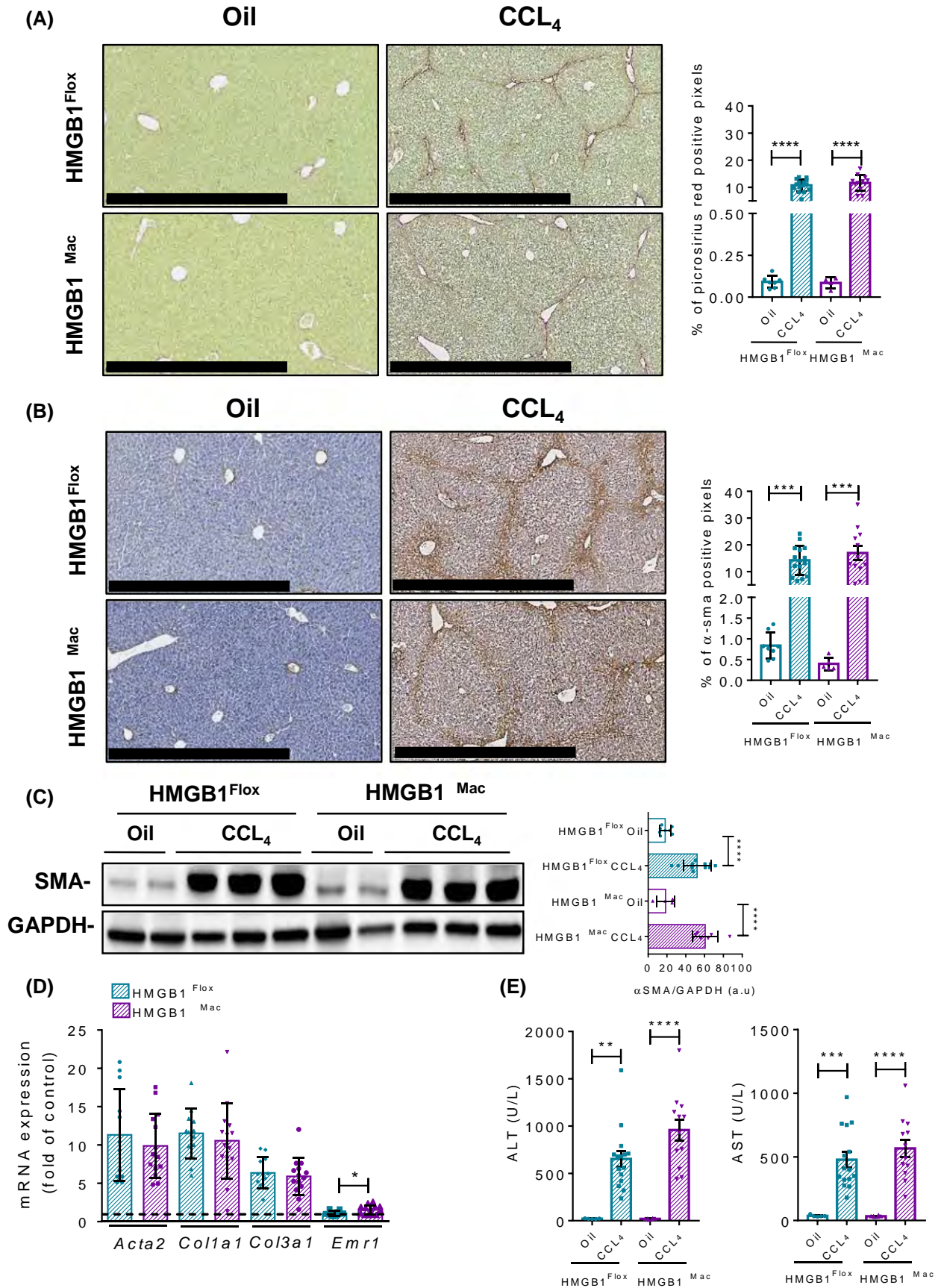
**FIGURE 1** High mobility group B1 (HMGB1) regulation during fibrosis and validation and characterization of macrophage-specific deletion of HMGB1. Representative immunoblotting against HMGB1 in oil (n = 9) or CCL<sub>4</sub>-treated (n = 15) liver using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein as a loading control (A). Representative immunoblotting against HMGB1 in liver extracts from sham (n = 9) or BDL (n = 4) animals using GAPDH protein as a loading control (B). Peritoneal macrophages isolated from HMGB1<sup>Flox</sup> (n = 3) and HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> mice (n = 3) were analyzed by immunoblotting against HMGB1 and GAPDH (C). Cells from liver stromal vascular fraction, isolated from HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> and HMGB1<sup>Flox</sup> mice, were analyzed by immunoblotting against HMGB1 and GAPDH (D). Cells from lung stromal vascular fraction, isolated from HMGB1<sup>Flox</sup> (n = 3) and HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> mice (n = 3), were analyzed by immunoblotting against HMGB1 and GAPDH (E). Bone marrow-derived macrophages (BMDM) isolated from HMGB1<sup>Flox</sup> (n = 3) and HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> mice (n = 3) were analyzed by immunoblotting against HMGB1 and GAPDH (higher panel). BMDM isolated from HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> mice were analyzed by immunofluorescence confocal microscopy to detect HMGB1 (red) while nuclei were stained with DAPI (blue) (lower panel). Scale bar: 5  $\mu$ m (F). Liver extracts of HMGB1<sup>Flox</sup> (n = 9) and HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> (n = 6) mice were analyzed by western blotting directed against  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (G). Representative images of liver fibrosis determined by picosirius Red staining from HMGB1<sup>Flox</sup> (n = 9) and HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> (n = 6) mice. Scale bar: 500  $\mu$ m (H). Representative images of myofibroblast activation determined by  $\alpha$ -SMA immunostaining from HMGB1<sup>Flox</sup> (n = 9) and HMGB1 <sup>$\Delta$ Mac</sup> (n = 6) mice liver sections. Scale bar: 500  $\mu$ m (I)



Cambridge, UK) followed by a biotinylated goat anti-rat antibody (BA-9400; Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA) and streptavidin-HRP (DY998; R&D systems, Minneapolis, MN) with 3-3'-Diaminobenzidine (DAB) as substrate (11718096001; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Stained slides were scanned using a Nanozoomer scanner (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). Quantification was performed using Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) software.

### 2.13 | Statistics

Analyses are performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). All data are expressed as mean  $\pm$  SEM, except otherwise indicated, statistical significance was determined by *t* test, Mann-Whitney or two-way ANOVA tests. *P* values  $<0.05$  were considered significant ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ;  $****P < 0.0001$ ).



**FIGURE 2** Macrophage-specific deletion of high mobility group B1 (HMGB1) does not modify liver fibrogenesis after CCL<sub>4</sub> treatment. Representative pictures of picrosirius red staining of HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> of liver section and quantification of positive pixels per liver section. Scale bar: 500 μm (A). Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against α-smooth muscle actin (α-SMA) and quantification of positive pixels per liver section. Scale bar: 500 μm (B). Liver extracts from HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> were analyzed by western blotting directed against α-SMA (C). Liver mRNA expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the dotted line indicates the baseline (D). Hepatic injury in HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> was determined by alanine transaminase (ALT) (left panel) and aspartate transaminase (AST) (right panel) levels (E). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. Data are expressed as means ± SEM. n = 9 in HMGB1<sup>Flox</sup>-oil group; n = 6 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-oil group; n = 15 in HMGB1<sup>Flox</sup>-CCL<sub>4</sub> group; n = 12 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-CCL<sub>4</sub> group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001 vs oil/CCL<sub>4</sub>

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Liver HMGB1 levels are upregulated during liver fibrosis

As HMGB1 is thought to be a determinant player in fibrogenesis, we first characterized the expression levels of HMGB1 during fibrosis progression in the liver. Using two models of chemically (CCL<sub>4</sub>) or surgically (BDL)-induced liver fibrosis, we show that HMGB1 protein levels were strongly upregulated in fibrotic livers compared to control livers (Figure 1A,B) suggesting a possible role of HMGB1 during fibrogenesis. To determine whether macrophage-derived HMGB1 could be responsible for fibrosis progression, we generated mice specifically deleted for *Hmgb1* gene in macrophages (HMGB1<sup>ΔMac</sup>) by crossing LysM-Cre<sup>29</sup> and HMGB1-floxed transgenic mice.<sup>30</sup> Besides getting a clear recombination in the *Hmgb1* gene locus (Figure S1A,B), western blotting analysis demonstrated an efficient deletion of HMGB1, in vivo in naïve peritoneum macrophages or in resident macrophages from stromal vascular fraction of liver or lungs with 88%, 55%, and 98% of deletion, respectively (Figure 1C-E) and in vitro in BMDM with 99% deletion using immunoblotting or immunocytofluorescence (Figure 1F). Upon basal conditions, compared to HMGB1<sup>Flox</sup>, HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice did not show any detectable differences of fibrosis features with comparable protein levels of α-SMA protein as measured by immunoblotting (Figure 1G) and normal picrosirius red staining surrounding liver vessels and staining of vascular smooth muscle cells (Figure 1H,I).

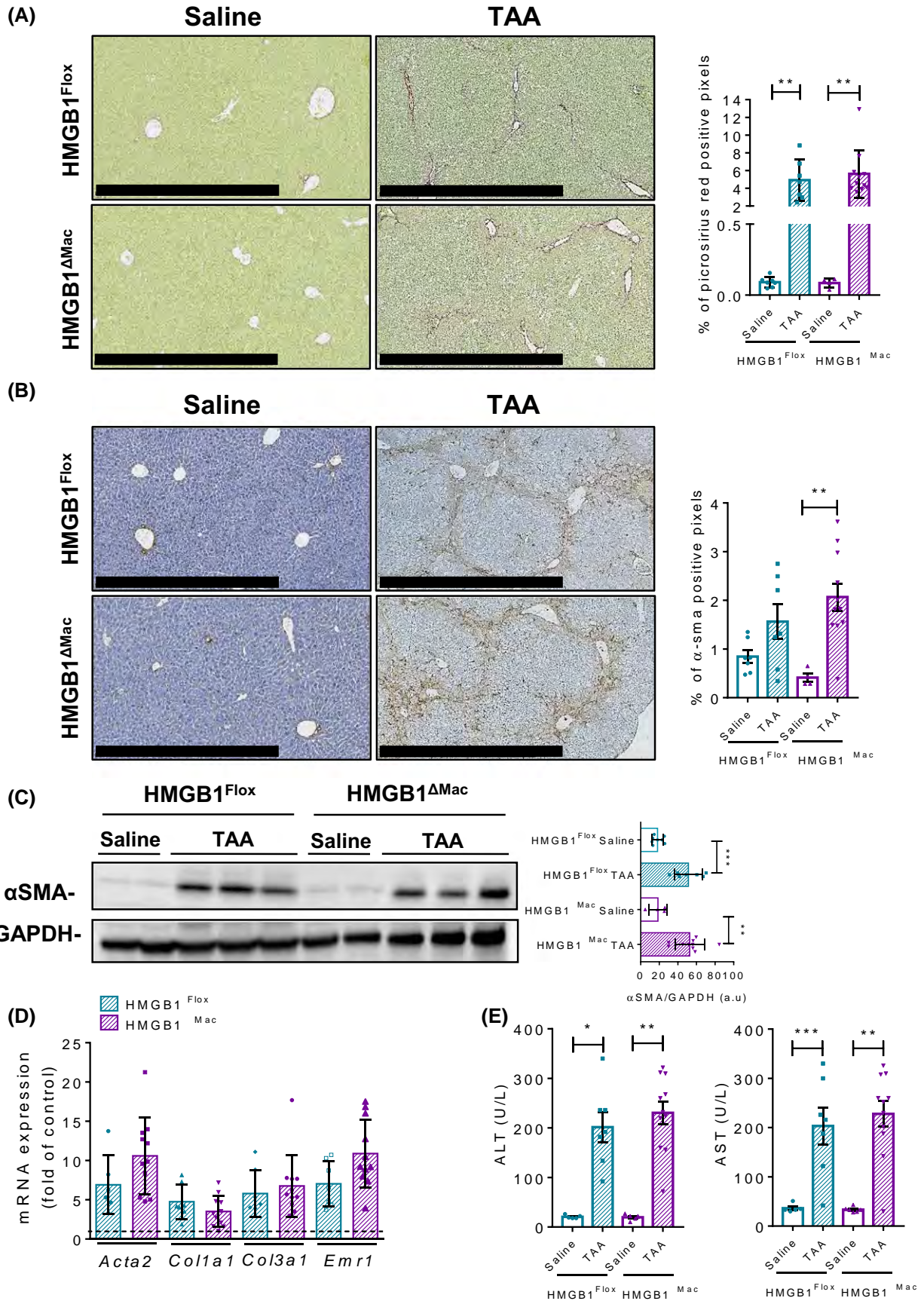
#### 3.2 | HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice do not have an increased liver fibrogenesis after CCL<sub>4</sub> treatment

To determine whether macrophage-derived HMGB1 is playing a key role in fibrogenesis, we first studied liver fibrosis. In this purpose, HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice were treated with eight i.p injections of carbon tetrachloride (CCL<sub>4</sub>) and were euthanized 2 days after the last injection. *Hmgb1* gene deletion has been carefully monitored using deletion PCR on whole liver DNA extract from both HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure S1C). Following CCL<sub>4</sub> treatment,

HMGB1<sup>Flox</sup> mice exhibited a significant accumulation of collagen compared to oil-treated mice as shown by picrosirius red staining (Figure 2A), but no differences were detected between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice. Similarly, HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice displayed comparable levels of α-SMA immunostaining (Figure 2B). Moreover, there were no differences in α-SMA protein levels (Figure 2C) as well as similar mRNA expression levels of fibrogenic and pro-inflammatory markers such as *Acta2*, *Ccn2*, *Col1a1*, *Col3a1*, *Tnfa*, and *Il-6* except for *Emr1* and *Il-1β* which were upregulated in HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 2D; Figure S2A). Finally, while CCL<sub>4</sub> treatment induced a pronounced liver injury compared to oil-treated mice, there were no differences in serum ALT or AST levels between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 2E). To rule out a possible overpowering effect of 8× CCL<sub>4</sub> on HMGB1 potential fibrogenic effect, we used a less severe experimental setup, where HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice were subjected to only four injections of CCL<sub>4</sub>. Even on a shorter CCL<sub>4</sub> model, HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice displayed the same extent of fibrosis in the liver (Figures S2F & S3A-E), suggesting that macrophage-derived HMGB1 does neither contribute to early fibrogenic events during fibrosis progression.

#### 3.3 | HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice do not display increased TAA-induced liver fibrosis

To confirm these findings in a second well-established model of chemical-induced liver fibrogenesis, we next challenged mice using TAA. HMGB1<sup>ΔMac</sup> and HMGB1<sup>Flox</sup> mice were treated with 18 i.p injections of TAA. As performed on CCL<sub>4</sub> model, *Hmgb1* gene deletion was carefully monitored using deletion PCR on whole liver DNA extract from both HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure S1D). Similar to our results obtained in the CCL<sub>4</sub> model, we did not detect any differences between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice. After TAA treatment, HMGB1<sup>Flox</sup> mice exhibited a pronounced deposition of fibrillar collagen and α-SMA staining compared to saline-treated mice but the increase in fibrotic markers was identical between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 3A,B). In addition, α-SMA (Figure 3C) protein levels, as well as mRNA expression of classical fibrosis



**FIGURE 3** Macrophage-specific deletion of high mobility group B1 (HMGB1) does not modify liver fibrogenesis after TAA treatment. Representative pictures of picosirius red staining of HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> of liver section and quantification of positive pixels per liver section. Scale bar: 500 μm (A). Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against α-smooth muscle actin (α-SMA) and quantification of positive pixels per liver section. Scale bar: 500 μm (B). Liver extracts from HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> were analyzed by western blotting directed against α-SMA (C). Liver mRNA expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the dotted line indicates the baseline (D). Hepatic injury in HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> was determined by alanine transaminase (ALT) (left panel) and aspartate transaminase (AST) (right panel) levels (E). Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Data are expressed as means ± SEM. n = 6 in HMGB1<sup>Flox</sup>-saline group; n = 6 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-saline group; n = 7 in HMGB1<sup>Flox</sup>-TAA group; n = 11 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-TAA group. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs saline/TAA

and inflammatory markers such as *Acta2*, *Ccn2*, *Colla1*, *Col3a1*, *Emr1*, and *Il-6* except for *Tnfa*, *Il-1β* which were upregulated in HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 3D; Figure S2B) and serum levels of liver injury markers (Figure 3E), were comparable in HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice subjected to TAA treatment.

### 3.4 | HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice do not have an increased hepatic fibrogenesis after BDL

To corroborate these findings, we used a complementary model of cholestatic liver injury, bile duct ligation (BDL). As done previously, *Hmgbl* gene deletion was carefully monitored using deletion PCR on whole liver DNA extracted from both HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure S1E). Twenty-one days after BDL, HMGB1<sup>Flox</sup> mice displayed severe hepatic fibrosis as shown by picosirius red staining but again no differences were detected between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 4A). Expression of α-SMA was also increased in HMGB1<sup>Flox</sup> mice assessed by immunohistochemistry and immunoblotting but with no differences compared to HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 4B,C). mRNA expression of fibrogenic markers *Acta2*, *Ccn2*, *Colla1*, *Col3a1*, *Acta2*, *Colla1*, *Col3a1*, and inflammatory markers *Emr1* and *Il-6*, except for *Tnfa*, *Il-1β* which were upregulated in HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 4D; Figure S2C) as well as serum ALT and AST levels, were also similar in HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 4D,E).

As several studies suggested a direct effect of HMGB1 on hepatic stellate cells (HSCs) in the development of liver fibrosis,<sup>31,32</sup> we sought to further study the role macrophage derived-HMGB1. Because (a) macrophages have a key role in promoting HSC activation, HSC survival, and liver fibrosis,<sup>26,33</sup> (b) LPS promotes liver fibrosis<sup>34</sup> and (c) macrophages can release HMGB1 following LPS stimulation, we used LPS-stimulated conditioned media from HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> macrophages to determine the role of macrophage-derived HMGB1 in HSC activation. Of note, LPS strongly increased HMGB1 release over time, with a peak at 48 hours, which was almost completely blocked in HMGB1-deleted macrophages (Figure S4A). Forty-eight hour-conditioned medium (CM) from LPS-stimulated BMDM increased the activation of HSC compared to CM from unstimulated

BMDM as shown by mRNA expression fibrogenic markers *Colla1*, *Colla2*, and *Acta2* (Figure S4B-D). However, HSC activation did not differ between CM prepared from bone marrow isolated from HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice, demonstrating that the pro-fibrotic effects of BMDM are independent of HMGB1 (Figure S4B-D).

### 3.5 | Macrophage-derived HMGB1 does not play a crucial role in UUO-induced kidney fibrosis

As the results collected on three relevant injury models unexpectedly showed no effects of HMGB1 deletion on liver fibrosis, we next tested whether the role of macrophage HMGB1 in kidney fibrosis, where fibrotic mechanisms are slightly different compared to the liver. For this purpose, we employed a classical model of tubulointerstitial fibrosis induced by UUO.<sup>27</sup> As performed in the liver, *Hmgbl* gene deletion was carefully monitored using deletion PCR on whole kidney DNA extract from both HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure S1F). Seven days after UUO, HMGB1<sup>Flox</sup> mice displayed typical fibrosis features with a drastic deposition of fibrillar collagen and myofibroblasts activation (Figure 5A,B) compared to sham-operated mice, as determined by immunohistochemistry. But similar to the liver fibrogenesis models, no differences were detected between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice in UUO-induced kidney fibrosis progression. Moreover, α-SMA protein levels (Figure 5C), as well as mRNA expression of fibrogenic and inflammatory genes *Acta2*, *Ccn2*, *Colla1*, *Col3a1*, *Emr1*, *Il-1β*, and *Il-6* were comparable between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice in the harvested kidney following UUO, except for *Tnfa* which was upregulated in HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 5D; Figure S2D).

### 3.6 | HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice do not display an increased cardiac fibrosis after TAC

In addition to the liver and kidney, we finally assessed the impact of HMGB1 deletion in macrophages on fibrosis progression in the heart as it has been reported recently that HMGB1 could play a key role in cardiac fibrosis,<sup>22</sup> using TAC as a well-established and clinically relevant model of cardiac

fibrosis.<sup>35</sup> As performed previously, *Hmgb1* gene deletion was carefully monitored using deletion PCR on whole heart DNA extract from both HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure S1G). Twenty-eight days after TAC, HMGB1<sup>Flox</sup> mice displayed pronounced impairments of cardiac function such as left ventricular end-systolic and -diastolic dimension (Table 1) compared to sham-operated animals, accompanied with a strong collagen deposition (Figure 6A). But once again, HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice subjected to TAC showed a similar extent of functional alterations and extracellular matrix accumulation determined by picrosirius red staining or  $\alpha$ -SMA immunohistochemistry and immunoblotting (Table 1; Figure 6A-C). In addition, similar levels of mRNA expression of classical fibrogenic markers such as *Acta2*, *Ccn2*, *Colla1*, and *Col3a1* mRNA, and inflammatory marker *Emr1*, *Tnfa*, and *Il-1b* (except for *Il-6* which was up-regulated in HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice) mRNA were detected using real-time qPCR in operated HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 6D; Figure S2E).

### 3.7 | Thermoneutral housing has no incidence on fibrosis progression in HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice compared to HMGB1<sup>Flox</sup> mice

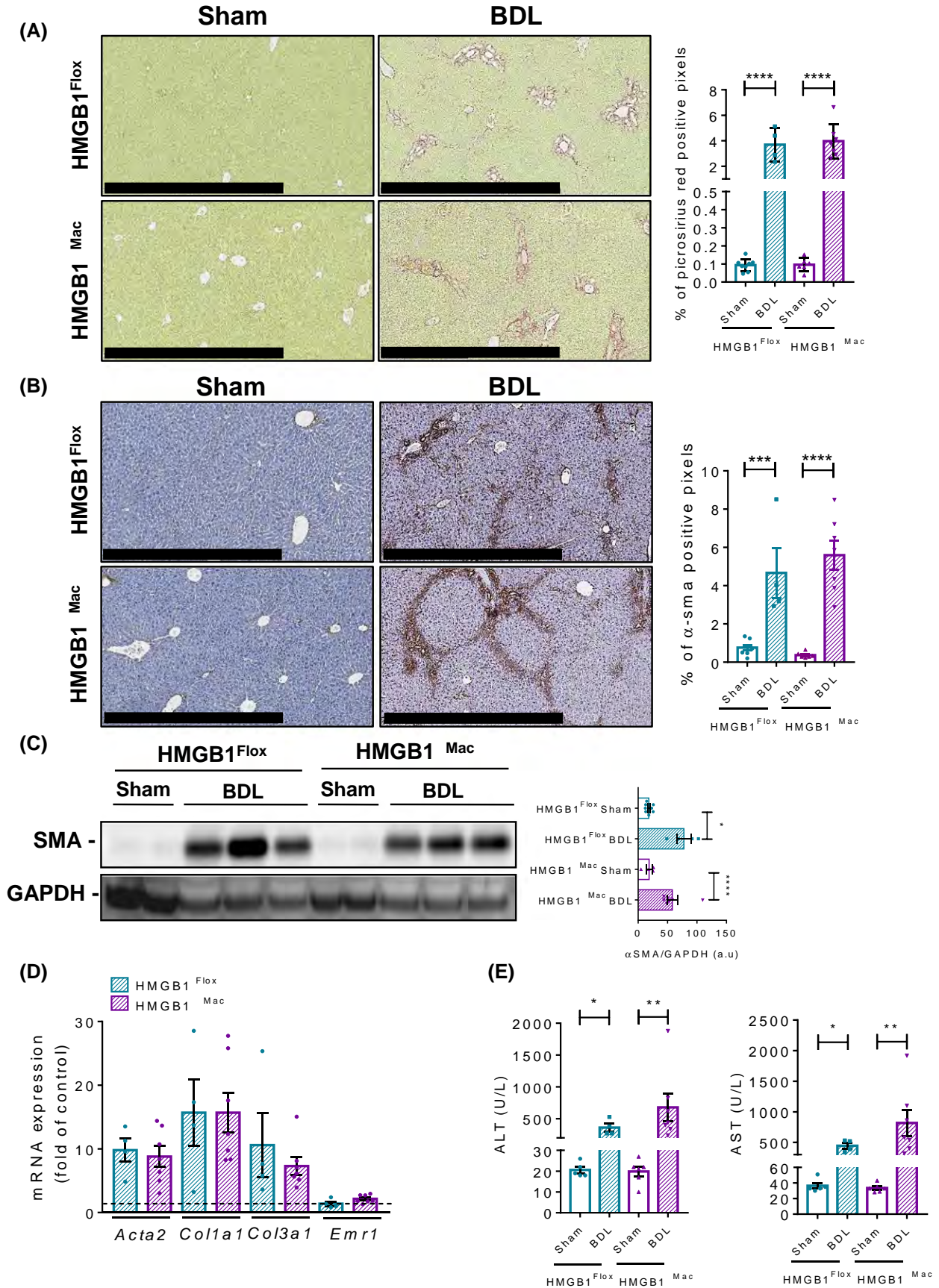
In the recent years, several striking studies have demonstrated that for rodent models, as opposed to thermoneutral housing (30-32°C), room temperature housing (20-22°C) initiates and maintains a chronic cold stress that dramatically impairs physiology and immune response (eg, to inflammatory stimulus).<sup>36-38</sup> As a severe alteration of immune responses has pronounced consequences on fibrosis progression,<sup>39,40</sup> we hypothesized that thermoneutral housing, rather than room temperature housing performed so far, might be a more relevant context to evaluate the impact of macrophage-derived HMGB1 deletion on fibrosis development. For this purpose, after 2 weeks of acclimation at 30°C, HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice were subjected to two fibrosis models: BDL-induced liver fibrosis and UUO-induced kidney fibrosis. As done at room temperature conditions, *Hmgb1* gene deletion has been carefully monitored using deletion PCR on whole liver or kidney DNA extract from both HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 1H-J). As expected, we found that

compared to room temperature, thermoneutral housing affected global mouse physiology, and remarkably HMGB1 circulating levels were higher in mice housed at 30°C compared to 20°C housing conditions (Figure 5A). In addition, serum ALT and AST levels (Figure 5B-C) and liver inflammation and fibrosis (Figure 5D-E) were increased when mice are housed at 30°C compared to 20°C suggesting a higher hepatocyte turnover at 30°C. In both models and similar to what we observed at room temperature, HMGB1<sup>Flox</sup> mice exhibited a severe deposition of collagen and myofibroblast activation compared to sham-operated animals (Figure 7A-D). But similar to room temperature housing, HMGB1<sup>Flox</sup>, and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice displayed the same extent of fibrosis progression induced by either BDL or UUO procedures determined by picrosirius red staining and immuno-detection (Figure 7A-D). Expression of  $\alpha$ -SMA using immunoblotting and mRNA expression of fibrogenesis markers as *Acta2*, *Ccn2*, *Colla1*, and *Col3a1* displayed similar levels after BDL and UUO between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice (Figure 7E-H, Figure S2G-H). Interestingly, most of the inflammatory markers *Emr1*, *Tnfa*, *Il-1b*, and *Il-6* were decreased in HMGB1<sup>ΔMac</sup> compared to HMGB1<sup>Flox</sup> mice (Figure 7E-H; Figure S2G,H) although no functional incidences have been emphasized. Finally, compared to sham-operated mice, BDL induced a pronounced liver injury (Figure S6A,B) but there were no differences in serum ALT or AST levels between HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice. In parallel, BDL and UUO procedures provoked a marked increase of circulating levels of HMGB1 (Figure S6C), albeit not significant, compared to sham-operated animals, and operated HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice displayed comparable amount of serum HMGB1 levels (Figure S6C). Altogether these results suggest that, despite a stronger level of fibrosis compared to room temperature conditions, thermoneutral housing did not reveal any role of macrophage-specific HMGB1 in fibrosis progression. Therefore, conclusions drawn from room temperature experiments were fully confirmed under thermoneutral conditions.

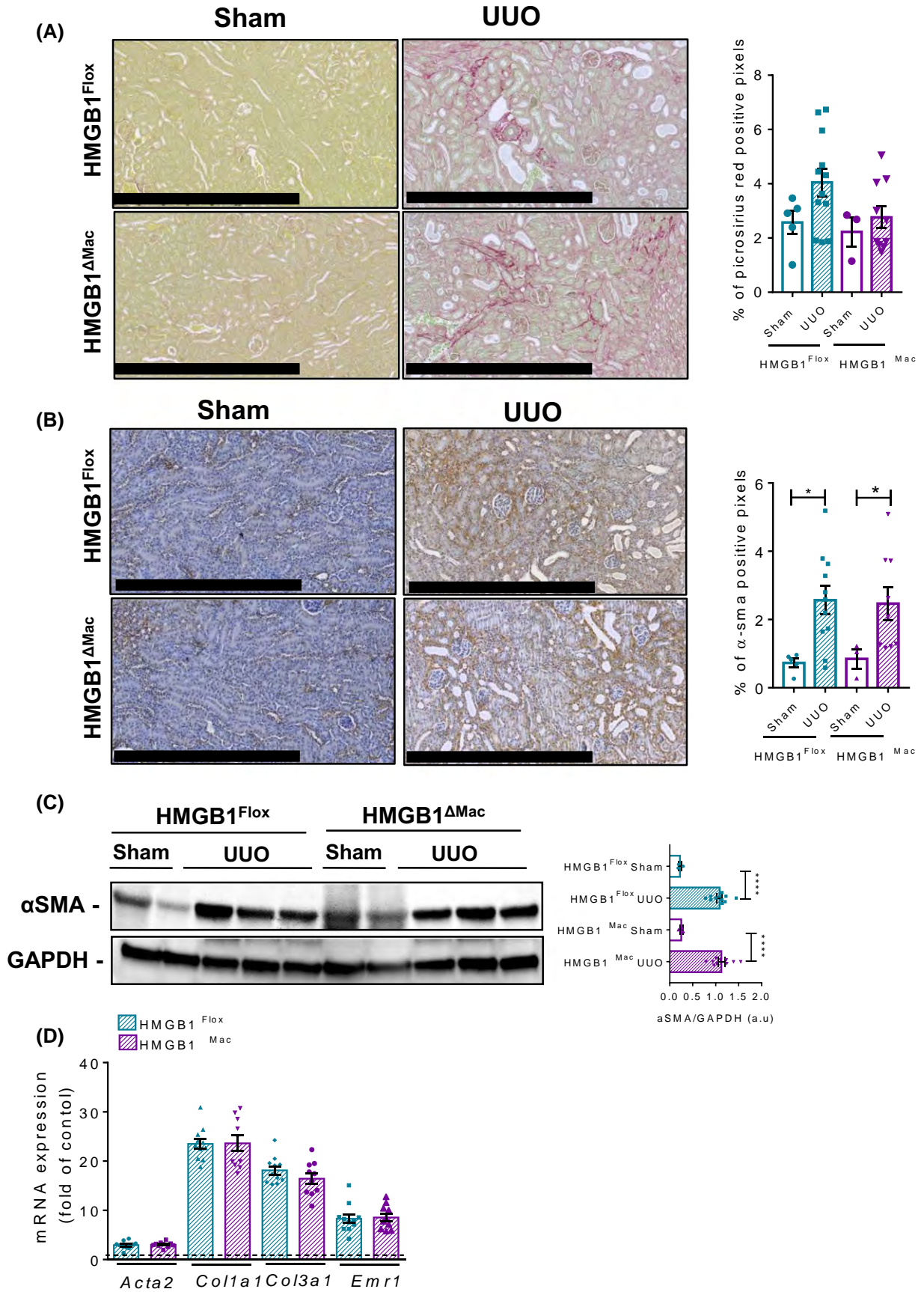
## 4 | DISCUSSION

In the expanding field of sterile inflammation biology, many open questions remain in regard to the effects of alarmin/DAMPs

**FIGURE 4** Macrophage-specific deletion of high mobility group B1 (HMGB1) does not alter liver fibrogenesis after BDL. Representative pictures of picrosirius red staining of HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> of liver section and quantification of positive pixels per liver section. Scale bar: 500  $\mu$ m (A). Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and quantification of positive pixels per liver section. Scale bar: 500  $\mu$ m (B). Liver extracts from HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> were analyzed by western blotting directed against  $\alpha$ -SMA (C). Liver mRNA expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the dotted line indicates the baseline (D). Hepatic injury in HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> was determined by alanine transaminase (ALT) (left panel) and aspartate transaminase (AST) (right panel) levels (E). Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. n = 6 in HMGB1<sup>Flox</sup>-sham group; n = 6 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-sham group; n = 4 in HMGB1<sup>Flox</sup>-BDL group; n = 7 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-BDL group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001 vs sham/BDL







**FIGURE 5** Macrophage-specific deletion of high mobility group B1 (HMGB1) does not play a role in UUO-induced kidney fibrosis. Representative pictures of picosirius red staining of HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> of kidney section and quantification of positive pixels per kidney section. Scale bar: 500 μm (A). Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against α-smooth muscle actin (α-SMA) and quantification of positive pixels per kidney section. Scale bar: 500 μm (B). Kidney extracts from HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice were analyzed by western blotting directed against α-SMA (C). Kidney mRNA expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the dotted line indicates the baseline (D). Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Data are expressed as means ± SEM. n = 3 in HMGB1<sup>Flox</sup>-sham group; n = 3 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-sham group; n = 12 in HMGB1<sup>Flox</sup>-UUO group; n = 10 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-UUO group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs sham/UUO

**TABLE 1** Echocardiographic and anatomical analysis as a function of transverse aortic constriction (TAC). Statistical analysis was performed with a two-way ANOVA analysis

Time post surgery	4 wk			
	HMGB1 <sup>Flox</sup> Sham	HMGB1 <sup>ΔMac</sup> Sham	HMGB1 <sup>Flox</sup> + TAC	HMGB1 <sup>ΔMac</sup> + TAC
Echocardiographic parameters				
LVEDD (mm)	3.443 ± 0.12	3.435 ± 0.11	4.018 ± 0.15**	3.846 ± 0.12**
LVESD (mm)	1.955 ± 0.09	1.98 ± 0.12	2.604 ± 0.22*	2.39 ± 0.16*
FS (%)	43.25 ± 1.93	42.25 ± 1.79	36.25 ± 3.29	38.36 ± 2.37
Anatomical parameters				
BW (g)	31.94 ± 0.54	30.49 ± 1.25	27.29 ± 0.90**	28.73 ± 0.69**
Heart weight (mg)	144.3 ± 7.14	152 ± 3.51	169.5 ± 11.21*	174.3 ± 6.38*
HW/TL (mg/mm)	78.27 ± 3.81	82.51 ± 1.70	97.8 ± 6.22**	98.6 ± 3.64**

Data are expressed as means ± SEM. n = 4 in HMGB1<sup>Flox</sup>/sham group; n = 4 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>/sham group; n = 8 in HMGB1<sup>Flox</sup>/TAC group; n = 13 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>/TAC group.

BW, body weight; FS, fractional shortening; HMGB1, high mobility group B1; HW/TL, heart weight to tibia length ratio; LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVESD, left ventricular end-systolic dimension; TAC, transverse aortic constriction.

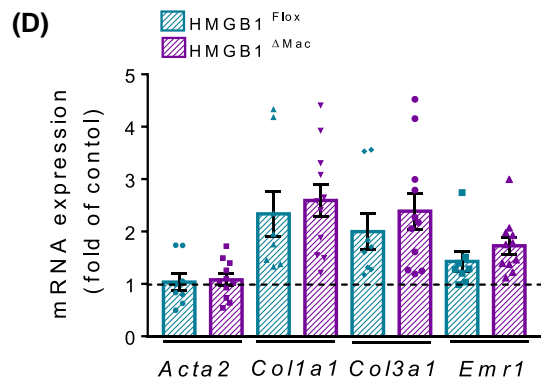
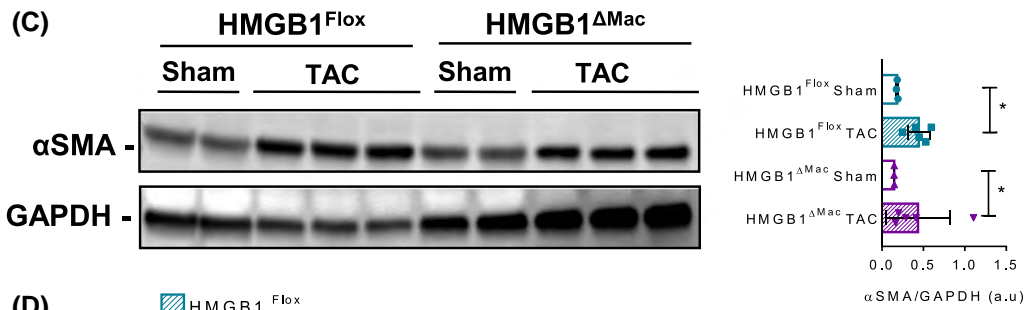
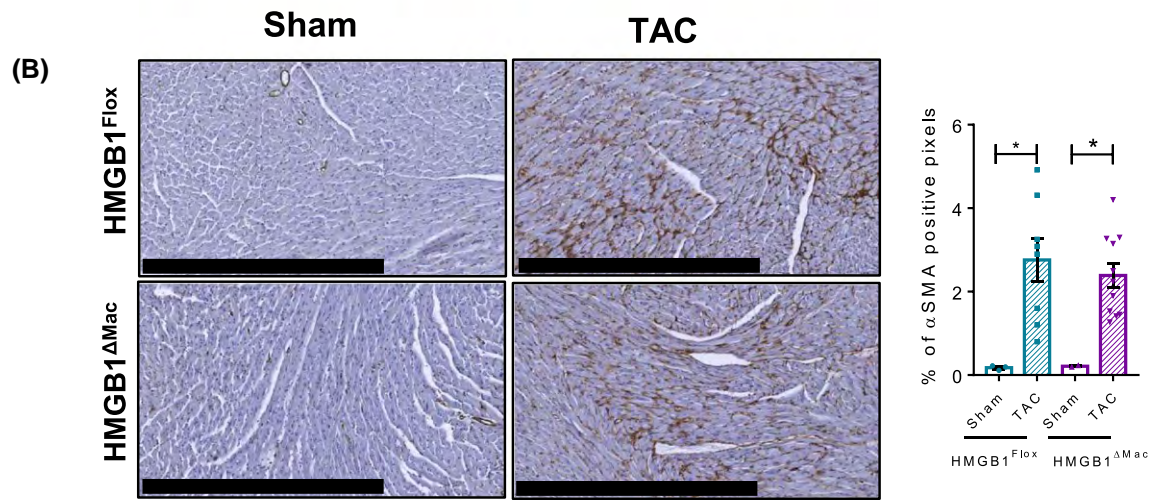
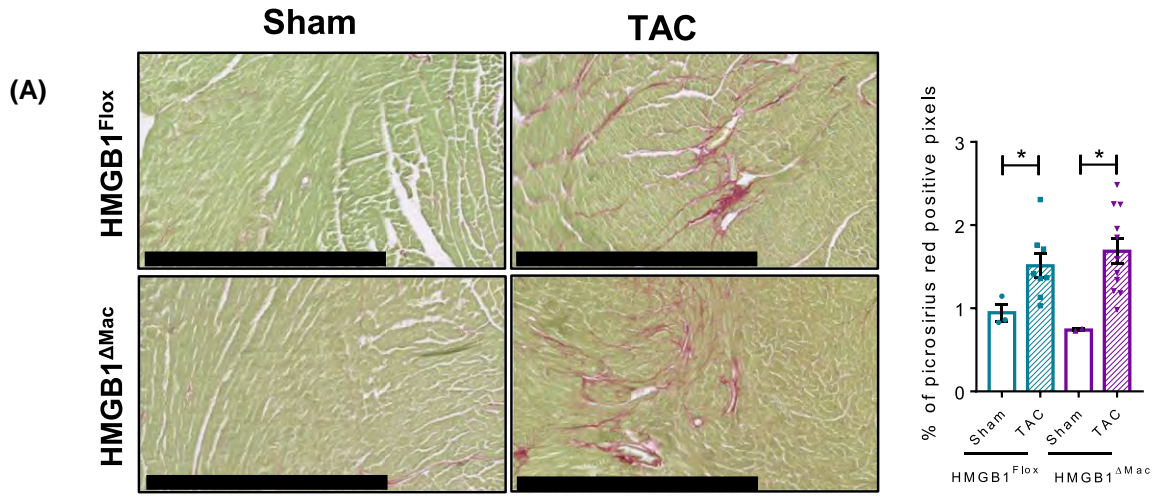
\**P* < 0.05.

\*\**P* < 0.01 vs sham/TAC.

in acute inflammation, tissue regeneration, scarring, and fibrosis. Here, using conditional deletion of HMGB1 protein specifically in macrophages, we clearly demonstrate that macrophage-derived HMGB1 protein does not play a key role in fibrogenesis in three different organs using a wide range of well-established models in vivo. In contrast, a recent study by Ge et al, using macrophage-specific genetic ablation (LysM-CRE) or neutralization strategies demonstrates that macrophage and hepatocyte-derived HMGB1 rather participates in liver fibrosis.<sup>41</sup> Employing cell-specific knockout of HMGB1 in macrophages in vivo, our report questions the contribution of a prototypical DAMP or pro-inflammatory cytokine HMGB1 in the pathogenesis of fibrosis. The opposite conclusions of both studies might be due to the use of different mice. While Ge et al used a conditional deletion of HMGB1 exons 2-3, we employed mice expressing floxed exons 2-4. It is hard to fully explain this obvious discrepancy but the presence of the exon 4 in the study of Ge et al may be a possible caveat as bioinformatics analysis tend to demonstrate the presence of an active open reading frame (ORF) even after CRE recombination, suggesting that exons 4 and 5 are still possibly translated and biologically active. These two different floxing strategies resulted in opposite results

on HMGB1 and mitochondrial quality control and autophagy mechanism in vivo,<sup>30,42</sup> but similar outcomes in liver cancer progression<sup>19,43</sup> without really finding a rational molecular explanation.<sup>44-46</sup> Further studies will be needed to decipher why both transgenic lines lead to similar conclusions in certain contexts and to opposite conclusions in specific settings.

The present work is clearly questioning the potential role of macrophage-derived HMGB1 during fibrosis and its relevance in vivo. Numerous reports have been published in recent years, showing in vitro that innate immune cells might actively secrete HMGB1, after an inflammatory challenge such as LPS. In vivo, few reports suggesting that *macrophage-derived* HMGB1 may be involved in acute inflammation diseases like in the colon or lungs.<sup>47,48</sup> But most of these in vivo studies used pharmacological agents such as ethylpyruvate that has been identified as a potential blocker of the nuclear to cytoplasmic translocation<sup>47</sup> typically observed in macrophages cell lines. In the meantime, other publications have demonstrated that epithelial cells might be capable of an active secretion of HMGB1 such as adipocytes, skin fibroblasts, or colon cancer cells<sup>49-51</sup> implying that ethylpyruvate may also prevent active secretion in these epithelial cells and would then not be specific of macrophages,



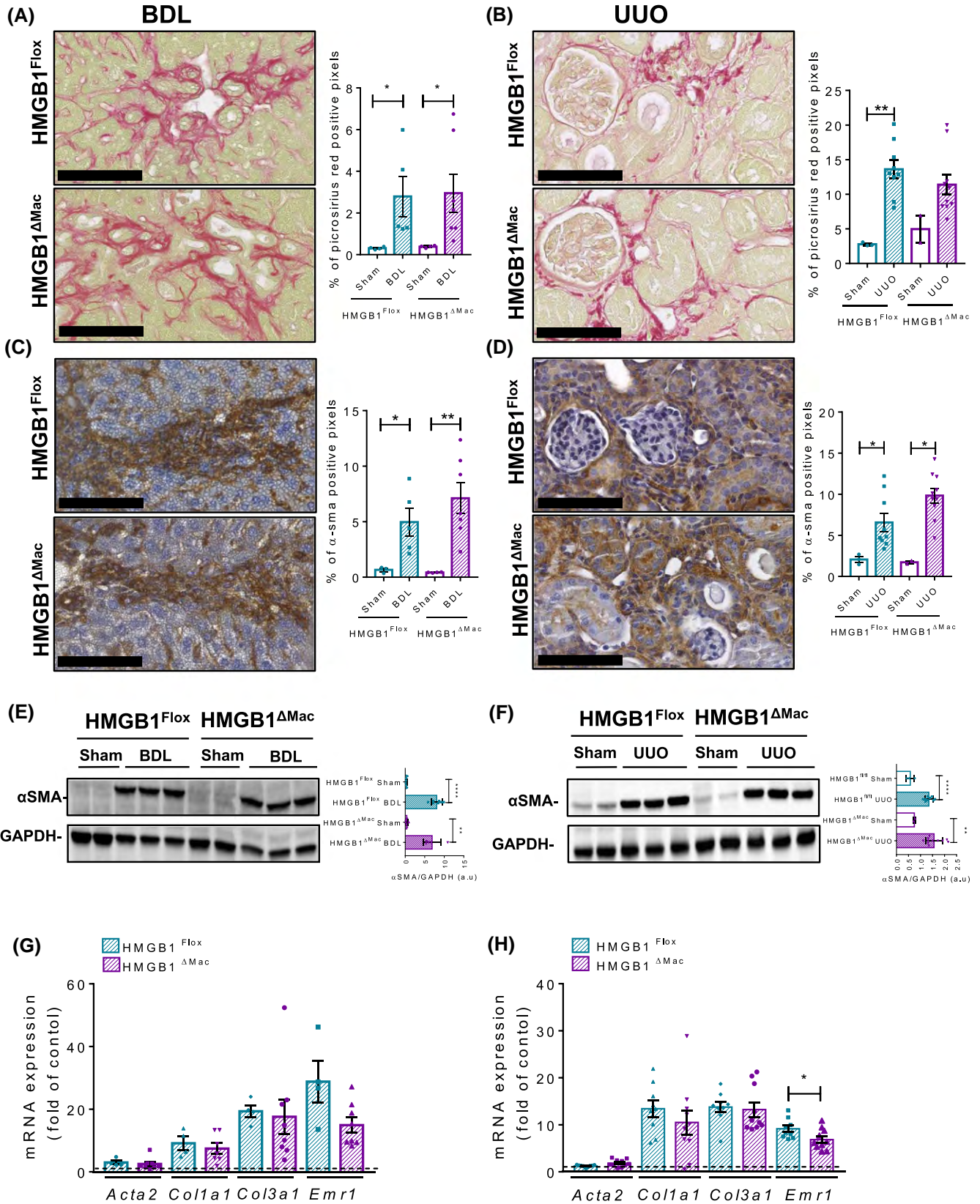
**FIGURE 6** Macrophage-specific deletion of high mobility group B1 (HMGB1) does not modify cardiac fibrogenesis after transverse aortic constriction (TAC). Representative pictures of picrosirius red staining of HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> of heart section and quantification of positive pixels per heart section. Scale bar: 500 μm (A). Representative pictures of immunohistochemical staining with an antibody against α-smooth muscle actin (α-SMA) and quantification of positive pixels per heart section. Scale bar: 500 μm (B). Heart extracts from HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> were analyzed by western blotting directed against α-SMA (C). Heart mRNA expression levels of classical fibrosis markers were detected using real-time RT-PCR, the dotted line indicates the baseline (D). Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Data are expressed as means ± SEM. n = 3 in HMGB1<sup>Flox</sup>-sham group; n = 3 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-sham group; n = 8 in HMGB1<sup>Flox</sup>-TAC group; n = 11 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-TAC group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs sham/TAC

undermining conclusions drawn from previous *in vivo* works using ethyl pyruvate. In this context, the *in vivo* role of macrophage-derived HMGB1 is still elusive, and only cell-specific deletion strategy might help to decipher precisely which processes are driven by macrophage-derived HMGB1. To the best of our knowledge, only a few studies have been already published using a genetic model of macrophage-specific inactivation of HMGB1. Among them, the work from Huebener et al demonstrated using two different CRE lines (MX1-Cre and VAV1-Cre) targeting bone marrow-derived cells, that circulating levels of HMGB1 were severely blunted after an LPS challenge *in vivo*,<sup>52</sup> meanwhile Yanai et al, using LysM-Cre deleter targeting more specifically macrophages, showed no changes in HMGB1 circulating levels after the same LPS stimulation.<sup>53</sup> Taken together these results tend to suggest that macrophages might be marginally involved, as opposed to *in vitro* studies, in active secretion process of HMGB1 after an LPS challenge questioning the relevance of HMGB1 active secretion by macrophages *in vivo*. It is possible that LPS is substantially different from stimuli encountered by macrophages during fibrogenic challenges such as CCL<sub>4</sub> injections. But while we noted that HMGB1 circulating and liver levels were increased during all fibrogenic models used in our study, we found no changes in HMGB1 levels in plasma (Figure S7A-E), but a slight decreases in fibrotic livers (Figure S7F,G) harvested from HMGB1<sup>ΔMac</sup> compared to HMGB1<sup>Flox</sup> mice supporting one more time a marginal contribution of macrophage-derived HMGB1 in the whole circulating pool but a rather more significant role at the tissue level in the liver after CCL<sub>4</sub> injection or following BDL (Figure S7F,G).

Despite being the best possible approach *in vivo*, HMGB1 cell-specific deletion may also have potential caveats that need to be considered. As now well established, HMGB1 is within the cell, an abundant nuclear factor conserved among all eukaryotic cells, which regulates chromatin conformation and gene regulation and once outside the cells, a danger signal promoting inflammatory reactions. By deleting HMGB1 in the macrophages, we de facto blunted both intra and extracellular pools of HMGB1. And in their report, Yanai et al stated that HMGB1 macrophage-specific deletion may have altered intracellular homeostasis and notably autophagy pathways,<sup>53</sup> which would have serious consequences on macrophages physiology, polarizing them toward a pro-inflammatory

phenotype with notably a higher capacity to secrete IL1β and IL-18 and promoting eventually macrophage cell death.<sup>53</sup> In this context, we cannot rule out that deletion of *Hmgb1* gene in macrophages may have altered macrophages function in our settings. Thus, we could hypothesize that generating such confounding factors (modifying macrophage global function and survival) could prevent us to properly assess the sole HMGB1 extracellular function *in vivo* and possible impact on fibrogenesis. Only sophisticated genetic strategies could help to discriminate between the role in macrophages of HMGB1 as a nuclear factor in one hand and as a secreted factor in the other hand.

Despite unexpected results on macrophage-derived HMGB1 and fibrogenesis, our study does not question the overall role of DAMPs in fibrogenesis. Several publications demonstrated using well-characterized DAMPs receptors, belonging to the pattern recognition receptor (PRR) family, that DAMPs and sterile inflammation players are definitely driving tissue scarring and fibrogenesis. Reports addressing potential HMGB1 receptors involvement in fibrogenesis clearly demonstrate that PRRs such as toll-like receptors (TLRs) or receptor for advanced glycation end products (RAGE) are causally connected to tissue scarring in the lungs, kidney, heart, or liver. TLR4 knockout mice are protected against fibrogenesis upon chemically or surgically induced fibrosis in the liver,<sup>34</sup> heart,<sup>54</sup> and lungs,<sup>55</sup> TLR2 knockout mice are preserved toward cardiac fibrosis,<sup>56</sup> and TLR9 has been involved in liver fibrosis.<sup>57,58</sup> And RAGE has also been connected to fibrogenesis in the lungs<sup>59,60</sup> and kidneys.<sup>61</sup> Thus, there is a consistent body of literature demonstrating that PRRs such as TLRs or RAGE are involved in fibrogenesis, therefore suggesting that DAMPs or other types of ligands besides HMGB1, may exert a pro-fibrotic activity.<sup>62</sup> In this context, HMGB1 certainly acts as DAMP in certain conditions or as an alarmin in other conditions depending on the cell source. Considering the complexity of sterile inflammation response, with such a variety of ligands and receptors, one could hypothesize that initiation of an inflammatory or pro-fibrotic response may depend on an unknown threshold of necrosis, type of tissue injury combined with micro-environmental conditions—not yet identified—which could affect and influence the channeling toward no response, or inflammatory and/or fibrotic



response. Further in vivo work is needed, using sophisticated genetic tools, to clearly assess how on a molecular level, how nuclear and secreted HMGB1 may drive

regeneration, inflammation, or fibrosis and to identify which cell source is specifically involved in each biological pathway.

**FIGURE 7** Thermoneutral housing has no incidence of fibrosis progression in mice with macrophage-specific HMGB1 deletion (HMGB1<sup>ΔMac</sup>) compared to HMGB1<sup>Flox</sup> mice. Representative pictures of picrosirius red staining of sham and operated HMGB1<sup>Flox</sup> mice and HMGB1<sup>ΔMac</sup> of liver (A) and kidney (B) and quantification of positive pixels per tissue section. Scale bar: 100 μm (A,B). Representative pictures of immunohistochemical staining of sham and operated HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice with an antibody against α-smooth muscle actin (α-SMA) in the liver (C) and kidney (D) and quantification of positive pixels per tissue section. Scale bar: 100 μm (C,D). Liver (E) and kidney (F) extracts from sham and operated HMGB1<sup>Flox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice were analyzed by western blotting directed against α-SMA (E,F). Liver (G) and kidney (H) mRNA expression levels of classical fibrosis markers expressed in fold of sham-operated animals (dotted line) were detected using real-time RT-PCR, the dotted line indicates the baseline (G,H). Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test. Data are expressed as means ± SEM. n = 4 (liver) n = 3 (kidney) in HMGB1<sup>Flox</sup>-sham group; n = 3 (liver & kidney) in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-sham group; n = 5 in HMGB1<sup>Flox</sup>-bile duct ligation (BDL) group; n = 7 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-BDL group; n = 12 in HMGB1<sup>Flox</sup>-unilateral ureteral obstruction (UUO) group; n = 12 in HMGB1<sup>ΔMac</sup>-UUO group. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001 vs sham/BDL or sham/UUO

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the phenotyping facility (Anexplo-US006/CREFRE, Toulouse, France) for all plasma analysis and technical assistance, GenoToul Genome and Transcriptome core facility for technical assistance, Dr. Bernard Masri and the cellular imaging facility of the Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (Toulouse, France) for helpful technical assistance. This study is supported by grants from INSERM, Paul Sabatier University, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0016/Holistic, J.-P.P) and Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité. J.P. is supported by a scholarship from Paul Sabatier University, E.P. is supported by a scholarship from Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0016/Holistic) and R.P. is supported by a scholarship from Région Midi-Pyrénées-INSERM (n° 15050341).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

J. Personnaz and E. Piccolo designed research, performed experiments, analyzed data, and wrote the paper; M. Branchereau, A. Filliol, R. Paccoud, E. Moreau, D. Calise, E. Riant and C. Heymes performed experiments and analyzed data, P. Gourdy generously provided LysM-CRE mice; R.F. Schwabe kindly provided HMGB1-floxed mice, designed experiments, and revised the manuscript; C. Dray and P. Valet provided fundings and revised the manuscript; J.-P. Pradère conceived the original hypothesis, designed all experiments, performed experiments, analyzed data, wrote the manuscript, provided fundings, and supervised the project.

## REFERENCES

- Mack M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol.* 2018;68-69:106-121.
- Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med.* 2018. S0098-2997(18)30038-4.
- Vannella KM, Wynn TA. Mechanisms of organ injury and repair by macrophages. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:593-617.
- Smigiel KS, Parks WC. Macrophages, wound healing, and fibrosis: recent insights. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20:17.
- Thannickal VJ, Zhou Y, Gaggari A, Duncan SR. Fibrosis: ultimate and proximate causes. *J Clin Invest.* 2014;124:4673-4677.
- Lee J-M, Yoshida M, Kim M-S, et al. Involvement of alveolar epithelial cell necroptosis in IPF pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;59:215-224. rcm.2017-00340C.
- Zhang W, Lavine KJ, Epelman S, et al. Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. *J Am Heart Assoc.* 2015;4:e001993-e001993.
- Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol.* 2015;6:422.
- Andersson U, Yang H, Harris H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Semin Immunol.* 2018;38:40-48.
- Kang R, Chen R, Zhang Q, et al. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2014;40:1-116.
- Dear JW, Clarke JI, Francis B, et al. Risk stratification after paracetamol overdose using mechanistic biomarkers: results from two prospective cohort studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018;3:104-113.
- Venereau E, De Leo F, Mezzapelle R, Careccia G, Musco G, Bianchi ME. HMGB1 as biomarker and drug target. *Pharmacol Res.* 2016;111:534-544.
- Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:139-162.
- Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med.* Rockefeller University Press. 2000;192:565-570.
- Gil M, Kim YK, Hong SB, Lee, KJ. Naringin decreases TNF-α and HMGB1 release from LPS-stimulated macrophages and improves survival in a CLP-induced sepsis mice. Mukhopadhyay P, editor. *PLoS ONE*, Public Library of Science. 2016;11:e0164186.
- El Gazzar M. HMGB1 modulates inflammatory responses in LPS-activated macrophages. *Inflamm Res.* 2007;56:162-167.
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* 2002;3:995-1001.
- Tirone M, Tran NL, Ceriotti C, et al. High mobility group box 1 orchestrates tissue regeneration via CXCR18. *J Exp Med.* 2018;215:303-318.
- Hernandez C, Huebener P, Pradere J-P, Antoine DJ, Friedman RA, Schwabe RF. HMGB1 links chronic liver injury to

- progenitor responses and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest.* 2018;128:2436-2451.
20. Khambu B, Huda N, Chen X, et al. HMGB1 promotes ductular reaction and tumorigenesis in autophagy-deficient livers. *J Clin Invest.* 2018;128:2419-2435.
  21. Lee G, Espirito Santo AI, Zwingenberger S, et al. Fully reduced HMGB1 accelerates the regeneration of multiple tissues by transitioning stem cells to G<sub>Alert</sub>. *Proc Natl Acad Sci.* 2018;115:E4463-E4472.
  22. Wu R-N, Yu T-Y, Zhou J-C, et al. Targeting HMGB1 ameliorates cardiac fibrosis through restoring TLR2-mediated autophagy suppression in myocardial fibroblasts. *Int J Cardiol.* 2018;267:156-162.
  23. Hamada N, Maeyama T, Kawaguchi T, et al. The role of high mobility group box1 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39:440-447.
  24. Tian S, Zhang L, Tang J, Guo X, Dong K, Chen S-Y. HMGB1 exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;308:F69-75.
  25. Troeger JS, Mederacke I, Gwak G-Y, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology.* 2012;143:1073-1083.e22.
  26. Pradere J-P, Kluwe J, De Minicis S, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology.* 2013;58:1461-1473.
  27. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009;75:1145-1152.
  28. Bissierier M, Berthouze-Duquesnes M, Breckler M, et al. Carabin protects against cardiac hypertrophy by blocking calcineurin, Ras, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II signaling. *Circulation.* 2015;131:390-400.
  29. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 1999;8:265-277.
  30. Huebener P, Gwak G-Y, Pradere J-P, et al. High-mobility group box 1 is dispensable for autophagy, mitochondrial quality control, and organ function in vivo. *Cell Metab.* 2014;19:539-547.
  31. Arriazu E, Ge X, Leung T-M, et al. Signalling via the osteopontin and high mobility group box-1 axis drives the fibrogenic response to liver injury. *Gut.* 2017;66:1123-1137.
  32. He Q, Fu Y, Ding X, et al. High-mobility group box 1 induces endoplasmic reticulum stress and activates hepatic stellate cells. *Lab Invest.* 2018;98:1200-1210.
  33. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* 2005;115:56-65.
  34. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007;13:1324-1332.
  35. Xia Y, Lee K, Li N, Corbett D, Mendoza L, Frangogiannis NG. Characterization of the inflammatory and fibrotic response in a mouse model of cardiac pressure overload. *Histochem Cell Biol.* 2009;131:471-481.
  36. Giles DA, Moreno-Fernandez ME, Stankiewicz TE, et al. Thermoneutral housing exacerbates nonalcoholic fatty liver disease in mice and allows for sex-independent disease modeling. *Nat Med.* Nature Publishing Group. 2017;23:829-838.
  37. Ganeshan K, Chawla A. Warming the mouse to model human diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13:458-465.
  38. Tian XY, Ganeshan K, Hong C, et al. Thermoneutral housing accelerates metabolic inflammation to potentiate atherosclerosis but not insulin resistance. *Cell Metab.* Elsevier. 2016;23:165-178.
  39. Wick G, Backovic A, Rabensteiner E, Plank N, Schwentner C, Sgonc R. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. *Trends Immunol.* Europe PMC Funders. 2010;31:110-119.
  40. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation. 2017;127:55-64.
  41. Ge X, Arriazu E, Magdaleno F, et al. High mobility group box-1 drives fibrosis progression signaling via the receptor for advanced glycation end-products in mice. *Hepatology.* 2018;68:2380-2404.
  42. Tang D, Kang R, Livesey KM, et al. High-mobility group box 1 is essential for mitochondrial quality control. *Cell Metab.* 2011;13:701-711.
  43. Chen R, Zhu S, Fan X-G, et al. High mobility group protein B1 controls liver cancer initiation through yes-associated protein -dependent aerobic glycolysis. *Hepatology.* 2018;67:1823-1841.
  44. Sun X, Tang D. Hepatocyte-specific *Hmgb1* deletion. *Autophagy.* 2015;11:1189-1191.
  45. Huebener P, Gwak GY, Schwabe RF. Comment on: HMGB1-dependent and -independent autophagy. *Autophagy.* 2015;11:1187-1188.
  46. Sun X, Tang D. HMGB1-dependent and -independent autophagy. *Autophagy.* 2014;10:1873-1876.
  47. Davé SH, Tilstra JS, Matsuoka K, et al. Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis. *J Leukoc Biol.* 2009;86:633-643.
  48. Entezari M, Javdan M, Antoine DJ, et al. Inhibition of extracellular HMGB1 attenuates hyperoxia-induced inflammatory acute lung injury. *Redox Biol.* 2014;2:314-322.
  49. Shimizu T, Yamakuchi M, Biswas KK, et al. HMGB1 is secreted by 3T3-L1 adipocytes through JNK signaling and the secretion is partially inhibited by adiponectin. *Obesity (Silver Spring).* 2016;24:1913-1921.
  50. Lee H, Park M, Shin N, et al. High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424:321-326.
  51. Wang L, He L, Bao G, He X, Fan S, Wang, H. Ionizing radiation induces HMGB1 cytoplasmic translocation and extracellular release. *Guo Ji Fang She Yi Xue He Yi Xue Za Zhi.* 2016;40:91-99.
  52. Huebener P, Pradere J-P, Hernandez C, et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis. *J Clin Invest.* 2015;125:539-550.
  53. Yanai H, Matsuda A, An J, et al. Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110:20699-20704.
  54. Li XX, Jiang DY, Huang XX, Guo SL, Yuan W, Dai HP. Toll-like receptor 4 promotes fibrosis in bleomycin-induced lung injury in mice. *Genet Mol Res.* 2015;14:17391-17398.
  55. Dong R, Wang Z, Zhao C, et al. Toll-like receptor 4 knockout protects against isoproterenol-induced cardiac fibrosis: the role of autophagy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20:84-92.
  56. Wang L, Li Y-L, Zhang C-C, et al. Inhibition of Toll-like receptor 2 reduces cardiac fibrosis by attenuating macrophage-mediated inflammation. *Cardiovasc Res.* 2014;101:383-392.



57. Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, et al. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology*. 2007;46:1509-1518.
58. Gäbele E, Mühlbauer M, Dorn C, et al. Role of TLR9 in hepatic stellate cells and experimental liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376:271-276.
59. Englert JM, Hanford LE, Kaminski N, et al. A role for the receptor for advanced glycation end products in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2008;172:583-591.
60. Ramsgaard L, Englert JM, Tobolewski J, et al. The role of the receptor for advanced glycation end-products in a murine model of silicosis. Morty RE, editor. *PLoS ONE*. 2010;5:e9604.
61. Gasparitsch M, Arndt A-K, Pawlitschek F, et al. RAGE-mediated interstitial fibrosis in neonatal obstructive nephropathy is independent of NF- $\kappa$ B activation. *Kidney Int*. 2013;84:911-919.
62. Chen L, Li J, Zhang J, et al. S100A4 promotes liver fibrosis via activation of hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2015;62:156-164.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**How to cite this article:** Personnaz J, Piccolo E, Branchereau M, et al. Macrophage-derived HMGB1 is dispensable for tissue fibrogenesis. *FASEB BioAdvances*. 2019;1:227–245. <https://doi.org/10.1096/fba.2018-01033>



## **DEUXIÈME OBJECTIF DE THÈSE :**

### **Étudier le rôle intracellulaire d'HMGB1 dérivé des macrophages au cours du choc inflammatoire aigu**

**Mise en contexte :** Mise à part le rôle extracellulaire d'alarme d'HMGB1, bien documenté dans la littérature, il existe un autre pendant des recherches axées sur HMGB1. Celles-ci concernent son rôle nucléaire/cytoplasmique. En effet, dans la cellule, notamment dans un macrophage, HMGB1 joue divers rôles, qui s'axent sur la dynamique chromatinienne (nucléaire) et le statut métabolique de la cellule (OXPHOS, Glycolyse, Autophagie) (L. Yang et al. 2014; Daolin Tang et al. 2011; Livesey et al., s. d.).

Ensemble, ces régulations du métabolisme intracellulaire, permettent, dans le cas du macrophage, d'imaginer qu'HMGB1 pourrait avoir un rôle dans la polarisation de ce dernier. En effet, le macrophage est une cellule avec des mécanismes d'adaptation métabolique très importants, qui influence directement leur polarisation. De façon simplifiée, des macrophages avec des OXPHOS et un catabolisme des lipides actifs seront caractérisés comme des macrophages M2. A l'opposé du spectre de la polarisation de macrophage (Figure 16 dans l'introduction), un macrophage avec des OXPHOS dysfonctionnelles, et une glycolyse importante (Effet Warburg) sera caractérisé comme un macrophage M1. L'ensemble des mécanismes sous-jacent à ces adaptations métaboliques ne sont encore pas tous élucidés, et plusieurs zones d'ombre persistent. HMGB1, par son rôle dans l'autophagie (autophagie, mitophagie) semble être un candidat pertinent pour étudier les remaniements métaboliques impliqués dans la polarisation des macrophages.

## **Le facteur nucléaire HMGB1 protège du choc inflammatoire via la modulation de la fonction lysosomale du macrophage**

Enzo Piccolo<sup>1</sup>, Jean Personnaz<sup>1</sup>, Hélène Authier<sup>2</sup>, Laetitia Bugarel<sup>1</sup>, Aliz e Dortignac<sup>1</sup>, Johanna Auriiau<sup>1</sup>, Hanna Barbier<sup>3</sup>, Floriant Bellvert<sup>3</sup>, Emmanuel Gautier<sup>4</sup>, Robert F. Schwabe<sup>5</sup>, Agnès Coste<sup>3</sup>, Jean-Charles Portais<sup>1,3,6</sup>, Philippe Valet<sup>1</sup>, Cedric Dray<sup>1</sup> & Jean-Philippe Pradère<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut RESTORE, UMR 1301, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), -CNRS-Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, Toulouse, France.

<sup>2</sup> UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France.

<sup>3</sup> MetaToul-MetaboHUB, National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics, Toulouse F-31077, France.

<sup>4</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, UMR\_S 1166), Sorbonne Université, Hôpital de la Pitié-Salp tri re, Paris, France

<sup>5</sup> Department of Medicine, Columbia University, New York, New York, USA.

<sup>6</sup> Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, Toulouse F-31062, France.

## Résumé

L'inflammation est un processus physiologique, qui constitue une première étape cruciale qui enclenche le processus de régénération ou de réparation. La dérégulation de ces réactions inflammatoires conduit à de nombreuses pathologies responsables d'environ 50% des décès enregistrés chaque année dans le monde. Il apparaît important de trouver de nouvelles cibles visant à réduire l'amplitude de la réponse inflammatoire et éviter toute hyper-réaction, notamment des macrophages. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'activation et à la fonction des macrophages sont liés à l'activité coordonnée de nombreux facteurs de transcription, eux-mêmes sous la dépendance de la dynamique chromatinienne. Au cours de ce travail, nous démontrons que le facteur nucléaire HMGB1 est un répresseur de l'activation des macrophages, et exerce un puissant effet anti-inflammatoire au cours d'un stress stérile ou infectieux. Les souris présentant une délétion spécifique du gène *Hmgb1* dans les macrophages spécifiquement, présentent une réaction inflammatoire exagérée, pro-M1, pouvant entraîner la mort des souris après une overdose de paracétamol ou une candidose péritonéale. Des études fonctionnelles et moléculaires, chez le macrophage *in vivo*, ont permis de montrer qu'HMGB1 favorise et soutient notamment la biogénèse des lysosomes et leur acidification, qui sont des fonctions cruciales conditionnant la polarisation de type M2. Pris tous ensemble, ces résultats indiquent de façon surprenante que le facteur nucléaire HMGB1 soutient/promeut la polarisation M2 du macrophage. HMGB1 pourrait donc constituer une nouvelle option thérapeutique de choix afin de mieux réguler la réaction inflammatoire.

## Introduction

Parmi l'ensemble des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire, les macrophages se trouvent en première ligne. Il s'agit d'une population très hétérogène qui joue un rôle crucial aussi bien dans l'initiation que dans la résolution de l'inflammation. La polarisation des macrophages est un phénomène crucial permettant d'orienter les macrophages vers des fonctions très différentes. Ce phénomène de polarisation, très complexe, et encore très débattu, est sous la dépendance de très nombreux facteurs environnementaux, mais aussi intrinsèques aux macrophages comme l'activité de plusieurs facteurs de transcription (FdT), elle-même dépendante de la dynamique chromatinienne (voir introduction de cette thèse). L'accessibilité de la chromatine, à travers sa compaction ou décompaction, est sous l'influence de protéines nucléaires comme les histones mais aussi les protéines de la famille HMG (high mobility group) qui sont les protéines, hors histones, les plus abondantes dans le noyau (voir introduction de cette thèse). Dans ce contexte, nous avons donc posé l'hypothèse que *le facteur nucléaire HMGB1 dans les macrophages pourrait jouer un rôle important dans la polarisation via la régulation de la dynamique chromatinienne et du transcriptome*. Pour cela, nous avons délété le gène *Hmgb1* dans les macrophages spécifiquement *in vitro* sur des cultures de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) et *in vivo* chez la souris. Sur ces modèles, en combinant une approche de transcriptomique et des études fonctionnelles, nous démontrons le rôle anti-inflammatoire de la forme nucléaire d'HMGB1, par son soutien à la polarisation M2 et notamment la régulation de la biogénèse et de la fonction des lysosomes.

## Résultats

### *Le macrophage HMGB1<sup>ΔMac</sup> présente une augmentation de la réponse inflammatoire*

Pour étudier l'impact possible de la délétion du gène *Hmgb1* sur la physiologie du macrophage *in vitro* et *in vivo*, nous avons généré une lignée de souris présentant une délétion du gène *Hmgb1* spécifiquement dans les macrophages (HMGB1<sup>ΔMac</sup>) en croisant les souris LysM-Cre (LysM-CRE<sup>+/+</sup>) avec les souris *Hmgb1* flox (HMGB1<sup>Flox</sup>). Les animaux contrôles utilisés dans notre étude, sont les souris *Hmgb1* HMGB1<sup>Flox</sup> n'exprimant pas la recombinaison CRE (HMGB1<sup>Flox</sup>). Pour la validation et la caractérisation de la délétion du gène *Hmgb1*, nous avons fait le choix de travailler sur les macrophages dérivés de la moelle osseuse (bone marrow derived macrophages notés "BMDM" dans le reste de l'étude) (**Figure 1**). Le BMDM est un modèle de culture primaire de macrophages très utilisé, qui permet d'étudier de nombreuses fonctions du macrophage *in vitro* (Van den Bossche et al. 2016; Zajd et al. 2020). Tout d'abord, comparativement aux BMDM sauvages (HMGB1<sup>Flox</sup>), les BMDM issus des souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent une diminution sévère du nombre de transcrits et du niveau protéique d'HMGB1 en intra- et extracellulaire, corroboré par le niveau d'expression de la recombinaison CRE (**Figure 1A-B**, **Suppl Figure 1A**). A l'état naïf (noté M0), c'est à dire sans aucune stimulation, les BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent une tendance à l'augmentation de l'expression des marqueurs inflammatoires comme *Dectine*, *Il-1β*, *Tlr2*, ou *Hif-1α* ainsi qu'une augmentation de la sécrétion basale de MCP-1 ou TNF- $\alpha$  (**Figure 1C**, **Suppl Figure 1C**). Après stimulation au LPS (1 $\mu$ g/mL), alors que tous les marqueurs inflammatoires comme *Mcp-1* ou *Il-1β* sont fortement induits chez BMDM HMGB1<sup>Flox</sup> (**Figure 1C-D**, **Suppl Figure 1B**) cette augmentation est plus sévère chez les BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> (**Figure 1C**). Cette réponse hyper-inflammatoire s'accompagne d'une augmentation significative de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires après 24 heures de stimulation LPS (10 ng/ml + IFN- $\gamma$ ) (**Figure 1D**). Ces résultats suggèrent que l'absence d'HMGB1 favoriserait la polarisation du macrophage vers le type M1 dès l'état basal (M0) et cet état pro-M1 serait amplifié même après stimulation au LPS. Compte tenu de l'impact délétère que pourrait jouer une hyper inflammation sur la viabilité des cellules, nous avons mesuré en cytométrie en flux, la quantité de BMDM HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> apoptotiques via l'utilisation de la sonde FAM-Flica, et aucune différence que ce soit en M0 ou en M1 n'a pu être identifiée (**Figure Supplémentaire 1D**). De plus, le calcul de la valeur de la charge adénylique (**Figure Supplémentaire 2E**) tout comme les taux intracellulaires d'ATP ou d'AMP déterminés par spectrométrie de masse (**Figure Supplémentaire 2F**) montrent une viabilité cellulaire optimale. En plus de ces marqueurs canoniques de l'activation des macrophages, nous avons évalué le métabolisme mitochondrial des BMDM-M0 HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> qui constitue un indicateur très fiable du profil inflammatoire du macrophage. Le métabolisme énergétique des BMDM mesuré par la technologie Seahorse, montre que les BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent une diminution globale de l'OCR (oxygen consumption rate, reflet de la respiration mitochondriale) (**Figure 1E**) s'accompagnant d'une diminution de la production d'ATP, de la respiration basale et maximale (**Suppl Fig 1G**) comparativement aux BMDM HMGB1<sup>Flox</sup>. En parallèle, la mesure de l'ECAR (extracellular acidification rate) reflétant l'activité glycolytique est plus importante chez le BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> comparativement aux BMDM HMGB1<sup>Flox</sup> (**Figure 1F**). Il est important de souligner que la délétion d'HMGB1 ne génère aucun changement dans la quantité et la qualité de mitochondrie totale (**Suppl Fig 1H-N**) déterminée par la quantité d'ADN mitochondrial (**Suppl Fig 1H**), de transcrits spécifiques aux mitochondries (**Suppl Fig 1I**), par imagerie confocale (**Suppl Fig 1J**). L'utilisation de sondes fluorescentes en cytométrie en flux a permis de ne montrer aucune différence entre les génotypes dans la totalité du chondriome (**Suppl Fig 1K-L**), le potentiel de membrane ou le stress oxydant global (**Suppl Fig 1M-N**). De plus, la consommation de glucose et la production de lactate, tout comme le profil des endométabolites, qui montrent chez les BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> une élévation des métabolites de glycolyse (G1-P, G6-P ou F6-P) montrent une fois encore un métabolisme glycolytique bien plus important chez le BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> comparativement aux BMDM contrôles (**Figure Supplémentaire 2A-C**). Ces analyses en lien avec la fonction mitochondriale et le métabolome appuient les résultats décrits auparavant, puisque l'utilisation préférentielle de la glycolyse plutôt que de la respiration mitochondriale chez le BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> est une signature métabolique du macrophage polarisé M1. Enfin, pour

terminer le phénotypage, nous avons mesuré la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui constitue une autre caractéristique importante de la physiologie du macrophage. A l'état naïf M0, les macrophages BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> produisent davantage de ROS que les contrôles (**Figure 1G**). Cette production de ROS exacerbée reste aussi supérieure à celle des BMDM HMGB1<sup>Flox</sup> même lorsque les macrophages sont polarisés M1 au préalable grâce à une stimulation LPS et IFN $\gamma$  pendant 24 heures (**Figure 1H**). Prises toutes ensemble, ces explorations montrent que la délétion du gène *Hmgb1* dans les macrophages induit un phénotype inflammatoire chez les macrophages en culture que ce soit à l'état basal (M0) ou après activation (M1) et ceci sans altération de la viabilité cellulaire.

### ***Les voies inflammatoires et la machinerie du lysosome sont affectées chez le macrophage, en l'absence du gène Hmgb1***

Pour mieux comprendre les voies de signalisation régulées par HMGB1 dans le macrophage, nous avons réalisé un profil d'expression génique sans à priori en séquençant des bibliothèques d'ARN (RNAseq) générés à partir des BMDM naïfs (M0) HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> (**Figure 2**). Les résultats du RNAseq montrent par l'analyse en composantes principales un profil transcriptomique différent en fonction des génotypes (**Figure 2A**). Cette différence de profil se traduit par une expression génique différentielle comme illustré par le volcano plot (**Figure 2B**) et la clusterisation non supervisée (**Figure 2C**). Ces analyses montrent que chez les macrophages HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent 1043 gènes dont l'expression est augmentée (Differentially expressed genes –"DEG UP") et 1006 gènes dont l'expression est significativement diminuée ("DEG-DOWN") comparativement aux macrophages contrôles. Des analyses bio-informatiques d'enrichissement utilisant la banque de données EnrichR révèlent que dans les DEG-UP, les composés cellulaires- suivant la classification Gene Ontology (GO)- les plus représentés concernent la machinerie du lysosome (GO:0005764 ou GO:0000323) (**Figure 2D**). De plus, l'évaluation des fonctions régulées par les DEG-UP selon la base de données KEGG montre que ces gènes réguleraient principalement des fonctions pro-inflammatoires telle que l'immunité Th17, les voies de signalisation dépendant du TNF $\alpha$  ou de NF-kB (**Figure 2F**). Une analyse des données fouillées (*data mining*) en utilisant l'algorithme de la base de données Jensen montrent aussi que les DEG-UP sont associés à la signalisation NF-kB, de la machinerie du lysosome mais aussi de façon intéressante de la signalisation mTOR (**Figure 2H**). L'ensemble des résultats indique que les DEG-UP pourraient soutenir un profil pro-inflammatoire des macrophages HMGB1<sup>ΔMac</sup>, ce qui confirme le phénotype pro-inflammatoire observé en **Figure 1**. Suivant la même logique d'analyse, nous avons étudié les fonctions biologiques régulées par les DEG-DOWN (**Figure 2G-I**). De façon similaire aux DEG-UP, la machinerie du lysosome, notamment son contenu (GO:0098852 ou GO:0042581) et sa fonction semblent régulées par les DEG-DOWN (**Figure 2G-H**). De plus, l'algorithme Jensen, associe ces fonctions biologiques à la fonction protéolytique de la vésicule (**Figure 2I**). De façon surprenante, ces analyses bioinformatiques non biaisées suggèrent que la délétion d'*Hmgb1* chez le macrophage induit un profil pro-inflammatoire qui pourrait être associé à des perturbations/modifications importantes de la machinerie du lysosome. En parallèle, nous avons comparé la signature transcriptomique (plutôt inflammatoire) des BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> à l'état M0 avec des BMDM-M1 traités au LPS 12-24 heures (GSE 103958). 254 DEG-UP et 432 DEG-DOWN identifiés chez les BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont communément retrouvés au cours de l'activation classique des BMDM M1 traités au LPS/IFN $\gamma$  (**Figure Supplémentaire 3A-B**). Ces résultats montrent qu'effectivement les BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent certaines similarités transcriptomiques avec des macrophages activés. Enfin, et afin d'identifier des FdT impliqués communément dans ces régulations transcriptionnelles, nous avons mené une analyse des motifs en utilisant la base données Opossum 3.0. Les FdT identifiés sont KLF-4, SP-1 ou NF-kB sur la famille DEG-UP (**Figure 2J**) ou Nkx2-5, Lhx3 ou Pdx-1 pour la famille des DEG-DOWN (**Figure 2K**). Parmi ces FdT, plusieurs comme KLF4, NF-kB ou Lhx3 ont été associés à la polarisation des macrophages et à leur activation, on peut donc supposer qu' HMGB1 pourrait réguler l'activité de ces FdT et donc par conséquent moduler la polarisation/activation des macrophages.

### ***La machinerie du lysosome est altérée en l'absence d'Hmgb1, chez le macrophage en culture***

La suite de notre travail à consister à établir un lien fonctionnel entre l'absence d'*Hmgb1* et une possible altération de la machinerie du lysosome mis en évidence par l'analyse non biaisée du transcriptome (**Figure 2**). Comme le montre la représentation de la classification non supervisée en **Figure 3A-B**, chez le BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> les gènes impliqués dans la fonction globale du lysosome (GO:0005764) ont une expression génique drastiquement réduite comparativement aux contrôles (**Figure 3A**). Sur les 147 gènes englobés par cette catégorie GO, 48 sont différentiellement et significativement ( $p_{adj} < 0,05$ ) régulés chez le macrophage HMGB1<sup>ΔMac</sup> et 47 sont significativement sous-exprimés. Cette modification du lysosome est corroborée par la réduction importante de l'expression des gènes codant pour différentes sous-unités de la pompe ATPase vésiculaire (v-ATPase), composantes essentielles de la membrane du lysosome et responsables de l'acidification du lysosome comme l'*Atp0v1a* ou l'*Atp6v0a1* (**Figure 3B**, **Figure Supplémentaire 4A**). Pour aller plus loin, et tester fonctionnellement ces résultats de transcriptomique, la quantité des lysosomes a été mesurée par cytométrie en flux en utilisant la sonde LysoTracker (**Figure 3C-D**). Les BMDM des deux génotypes soit à l'état naïf M0 ou M1 (24 heures de LPS (10 ng/mL) et IFN $\gamma$  (40 ng/mL)) ont d'abord été classés sur l'expression des marqueurs CD45 et F4/80. En M0 chez les populations CD45<sup>+</sup> F480<sup>+</sup>, la fluorescence émise par le lysotracker est inférieure chez les macrophages HMGB1<sup>ΔMac</sup> comparativement aux contrôles. A noter que l'ajout de bafilomycine (notée BafA), inhibiteur de la v-ATPase, diminue drastiquement l'acidification des lysosomes et bloque l'émission de toute fluorescence validant ainsi la pertinence de la sonde (**Figure 3C-D**). De plus la polarisation M1 entraîne une diminution importante de la quantité de lysosomes (**Figure Supplémentaire 4B**), mais que même dans ce contexte-là, les BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> ont un signal lysotracker diminué par rapport aux BMDM HMGB1<sup>Flox</sup> (**Figure 3C**). Selon la même stratégie, l'efficacité de l'équipement enzymatique du lysosome a été évaluée en mesurant la fluorescence émise par la protéolyse de l'ovalbumine en cytométrie en flux. De façon similaire, aux expériences précédentes la digestion de l'ovalbumine, reflet de l'activité protéolytique lysosomale, est significativement réduite chez les BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> comparativement aux BMDM HMGB1<sup>Flox</sup> à l'état naïf et M1 (**Figure 3D**). Ces résultats confirment donc les analyses non biaisées et permettent de suggérer que la quantité de lysosomes ainsi que leur acidification sont altérées, entraînant une réduction de l'activité protéolytique chez le BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> comparativement aux BMDM contrôles.

### ***La délétion d'Hmgb1 dans le macrophage in vivo conduit à une inflammation exagérée après une injection de CCL<sub>4</sub>, et à la mort après une overdose de paracétamol***

De façon à étudier les conséquences fonctionnelles que pourraient engendrer les perturbations décrites précédemment chez le BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> *in vivo*, nous avons soumis les souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> à deux challenges inflammatoires stériles. Avant toute chose, nous avons tout d'abord vérifié que le nombre de cellules immunes n'était pas altéré dans les tissus des souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> comparativement aux souris HMGB1<sup>Flox</sup> (**Figure Supplémentaire 5**) pour exclure tout biais dans l'interprétation de nos résultats.

Le premier challenge consiste en une injection intrapéritonéale d'une toxine hépatique, le tétrachlorure de carbone (CCL<sub>4</sub>) qui va provoquer une nécrose et apoptose massive des hépatocytes et donc un choc inflammatoire. Comme attendu, les souris injectées présentent une élévation des niveaux circulants des enzymes hépatiques (ALAT et ASAT) par rapport à des souris non traitées (données non montrées). Mais après traitement, les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent une augmentation supérieure à celle des souris HMGB1<sup>Flox</sup>, suggérant une augmentation de l'hépatotoxicité chez les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> (**Figure 4A**). L'analyse des biopsies de foie montrent une augmentation de l'infiltrat inflammatoire myéloïde et lymphoïde (*Cd45*, *Cd3*, *Cd4*, *Cd11b* ou *F4/80*) en utilisant des marqueurs inflammatoires en RT-qPCR (**Figure 4B**) ainsi qu'une augmentation des sécrétions inflammatoires circulantes telles que MCP-1, TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  (**Figure 4C**) chez les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> comparativement aux souris HMGB1<sup>Flox</sup>. Cette inflammation exagérée, observée chez les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> s'accompagne d'une augmentation importante des plages de nécrose (coloration H&E) et du nombre de macrophages (marquage CLEC4F) évalués par coloration immunohistochimique (**Figure 4D-E**). L'ensemble des résultats montre qu'après

un choc inflammatoire stérile, les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent une hyper-inflammation qui se traduit par une augmentation des dommages tissulaires qui pourrait avoir des conséquences importantes sur la fonction hépatique.

Pour compléter cette étude, et utiliser un modèle d'inflammation stérile plus pertinent sur le plan clinique, nous avons soumis les souris à une overdose de paracétamol qui entraîne de sévères altérations de la fonction hépatique pouvant conduire au décès des patients (comme décrit à la page 28 de l'introduction). De façon, identique au modèle CCL<sub>4</sub>, après injection d'une dose létale de paracétamol (500 mg/kg), alors que 50% des souris HMGB1<sup>Flox</sup> sont mortes 4 jours après injection, il ne faut que 48 heures pour que 50% des souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> décèdent (**Figure 4F**). La mort prématurée des animaux HMGB1<sup>ΔMac</sup> est à mettre en relation avec une augmentation du nombre de monocytes circulants et de neutrophiles et macrophages hépatiques quantifiés par cytométrie en flux (**Figure 4G-H**). Comme pour le CCL<sub>4</sub>, l'overdose de paracétamol conduit les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> à une inflammation exagérée qui entraîne une mort prématurée. L'ensemble des résultats suggère que le profil pro-M1 montré par les macrophages HMGB1<sup>ΔMac</sup> *in vitro* en culture primaire se traduit aussi par une hyper inflammation délétère voire létale chez la souris.

### ***La délétion d' Hmgb1 dans le macrophage in vivo conduit à une hyper-inflammation létale après un choc septique ou candidose péritonéale.***

Après avoir étudié le phénotype des souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> après un choc inflammatoire stérile, nous avons soumis ces mêmes souris à des challenges inflammatoires infectieux, qui mettent en jeu différentes fonctions chez les macrophages et d'autres voies de réponses inflammatoires que les chocs stériles (**Figure 5**).

Tout d'abord, les souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont injectées avec une faible dose de LPS (1 mg/kg en i.v), et les marqueurs ARN inflammatoires tels que *Mcp-1* ou *Cd11b* sont augmentés dans le foie chez les souris HMGB1<sup>Flox</sup> comparativement aux souris non traitées (**Figure 5A**). De plus, après une injection létale de LPS (17,5 mg/kg en i.v), les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> meurent de façon prématurée comparativement aux souris contrôles comme le montre la courbe de survie en **Figure 5B**. De plus, cette hyper-sensibilité au choc septique s'accompagne chez les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> d'une augmentation des marqueurs inflammatoires dans le foie (**Figure 5C**), d'une augmentation des taux circulants de cytokines inflammatoires comme l'IL-17, MCP-1 ou l'IFN- $\gamma$  (**Figure 5D**), d'une augmentation des monocytes-macrophages ou des NK circulants dans le sang (**Figure 5E**). Et dans la rate, la leucopénie consécutive au choc septique est moins prononcée chez la souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> que chez les souris contrôles en ce qui concerne les neutrophiles ou les NK (**Figure 5F**).

Ces résultats spectaculaires sont basés sur l'utilisation du LPS, qui est un peptide bactérien synthétique inerte qui certes est capable de mimer un choc septique mais qui a quand même de nombreuses limites. Pour contourner ces problèmes, nous avons soumis les souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> à une candidose péritonéale, pathologie causée par le champignon *Candida Albicans*. Après administration d'une dose létale de *C. Albicans*, les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent une tendance à une mortalité précoce comparativement aux souris contrôles (**Figure 5G**), suggérant comme les autres challenges inflammatoires, que les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> présentent une hypersensibilité au pathogène *C. Albicans*. Pour explorer le comportement des macrophages face à *C. Albicans*, les macrophages péritonéaux (pMAC) des souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont incubés *ex vivo* avec *C. Albicans*. De façon intéressante, lorsque les pMACs HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont incubés avec *C. Albicans* à basse température (4 heures à 4°C), la liaison au champignon est identique dans les deux génotypes (**Figure 5H**). Lorsque les pMACs sont incubés avec des *Candida*-GFP à 37°C pendant quatre heures, après internalisation, on retrouve une accumulation de fluorescence GFP, signe d'une protéolyse moins performante, chez les pMACs HMGB1<sup>ΔMac</sup> (**Figure 5I**), ce qui est corroboré par une diminution de l'expression des gènes codants pour les sous-unités de la pompe v-ATPase dans les pMACs (**Supplementary Figure 6A**). Dans le même temps, après plusieurs heures d'incubation, le nombre de colonies vivantes de *C. Albicans* a tendance à être plus important lorsque le champignon est mis en présence des pMACs HMGB1<sup>ΔMac</sup> (**Figure 5J**), suggérant une moindre efficacité dans la clairance du pathogène. De façon cohérente avec les résultats précédents, la production de ROS est drastiquement



réduite chez les pMACs HMGB1<sup>ΔMac</sup> lorsqu'ils sont en présence de *C. Albicans* comparativement aux pMACs contrôles, que ce soit à l'état naïf ou M1 (**Figure 5K-L**). Néanmoins les pMACs HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont toujours capables de s'activer suite à une incubation avec *C. Albicans*, comme le montre l'augmentation de l'expression des marqueurs inflammatoires comme *Tnf-α* ou *Rela* (**Figure Supplémentaire 6B**). L'ensemble de ces résultats suggère, qu'au cours d'un challenge infectieux, les macrophages présentant une délétion d' *Hmgbl*, ont une capacité fongicide réduite en lien avec une altération de l'efficacité du lysosome et de la production de ROS.

### **Discussion**

La réaction inflammatoire est une fonction physiologique fondamentale visant, en fonction du type de lésions tissulaires ou d'agressions pathogènes, à mobiliser le système immunitaire pour stopper la progression de ces événements délétères mais aussi à revenir à l'état initial en restaurant l'architecture et la fonction du tissu lésé. Néanmoins, la réaction inflammatoire peut être vue comme une lame à double tranchant, puisqu'une réaction dérégulée dans son amplitude et/ou dans la durée peut conduire à de nombreux dommages tissulaires, à la perte de fonction d'organes et même au décès. Par ce travail, en combinant des approches *in vitro* sur des cultures primaires de BMDM et des modèles *in vivo* de chocs inflammatoires stériles ou infectieux, nous montrons le rôle important que joue la protéine HMGB1 dans la physiologie des macrophages. HMGB1, dans sa forme nucléaire, semble jouer un rôle de rhéostat dans le choix de la polarisation M1 ou M2, qui en fonction du contexte physiopathologique peut avoir des conséquences délétères sur la fonction de l'organisme.

### **Rôle nucléaire vs rôle extracellulaire.**

HMGB1 est désormais connu pour sa fonction en tant que DAMPs, capable de signer une lésion tissulaire, puis d'initier et de maintenir la réaction inflammatoire. L'augmentation des taux circulants d'HMGB1 au cours d'un challenge inflammatoire stérile ou infectieux est décrite dans de nombreuses publications y compris dans l'article 1 de cette thèse. Cette augmentation sérique qui est la résultante du relargage passif d'HMGB1 par les cellules épithéliales nécrotiques et par la sécrétion active des cellules myéloïdes, induit une forte réaction inflammatoire. En revanche, les effets biologiques que nous observons sont avant tout anti-inflammatoires associés à la forme nucléaire d'HMGB1. La localisation subcellulaire d'HMGB1 dans les macrophages à l'état M0 est exclusivement nucléaire comme montré par immunocytochimie (**Figure 1A** article 1), ce qui suggère que l'ensemble des effets pro-inflammatoires observés chez le BMDM HMGB1<sup>ΔMac</sup> (**Figure 1**) sont probablement exclusivement dépendants des effets nucléaires. De plus, au cours d'une activation par le LPS et IFN $\gamma$  où après 12-24 heures de stimulation HMGB1 peut être retrouvé dans le milieu de culture (**Figure Supplémentaire 1A**), on peut poser l'hypothèse qu'HMGB1 puisse exercer, dans notre système de BMDM, des effets biologiques extracellulaire via sa liaison à des récepteurs membranaires. A ce jour, les récepteurs identifiés sont tous de nature pro-inflammatoire comme le TLR-4 ou RAGE, mais le caractère pro-inflammatoire du macrophage HMGB1<sup>ΔMac</sup> affaiblit cette hypothèse. De plus, dans la plupart des expériences, le milieu de culture est changé avant la mesure de la production de ROS où l'évaluation de la respiration mitochondriale, ce qui signifie qu'aucune forme d'HMGB1 ne se trouve présente dans le milieu extracellulaire pendant l'expérience, et la contribution d'une forme extracellulaire d'HMGB1 aux effets biologiques observés est donc peu probable. Pour vraiment évaluer les effets potentiels de cette forme extracellulaire d'HMGB1, sur la production de ROS par exemple, surtout après activation au LPS, des incubations avec un anticorps neutralisant sur des BMDM sauvages sont planifiées. Mais il est clair que chez la souris, après un choc inflammatoire, les deux formes d'HMGB1 coexistent. Au cours d'une candidose, les macrophages reçoivent des signaux pro-inflammatoires de la forme extracellulaire d'HMGB1 (D. Wang et al. 2020) ils sécrètent aussi HMGB1 pour amplifier la réaction inflammatoire, mais ont un pool nucléaire qui est aussi là pour réguler l'ampleur de la réponse. C'est certainement l'équilibre entre la réponse de chacun des pools qui régule l'amplitude de la réponse inflammatoire. Les approches pharmacologiques étant peu spécifiques, seules des approches génétiques chez l'animal permettront de quantifier la contribution respective de la forme d'HMGB1 nucléaire versus extracellulaire au cours du choc inflammatoire.

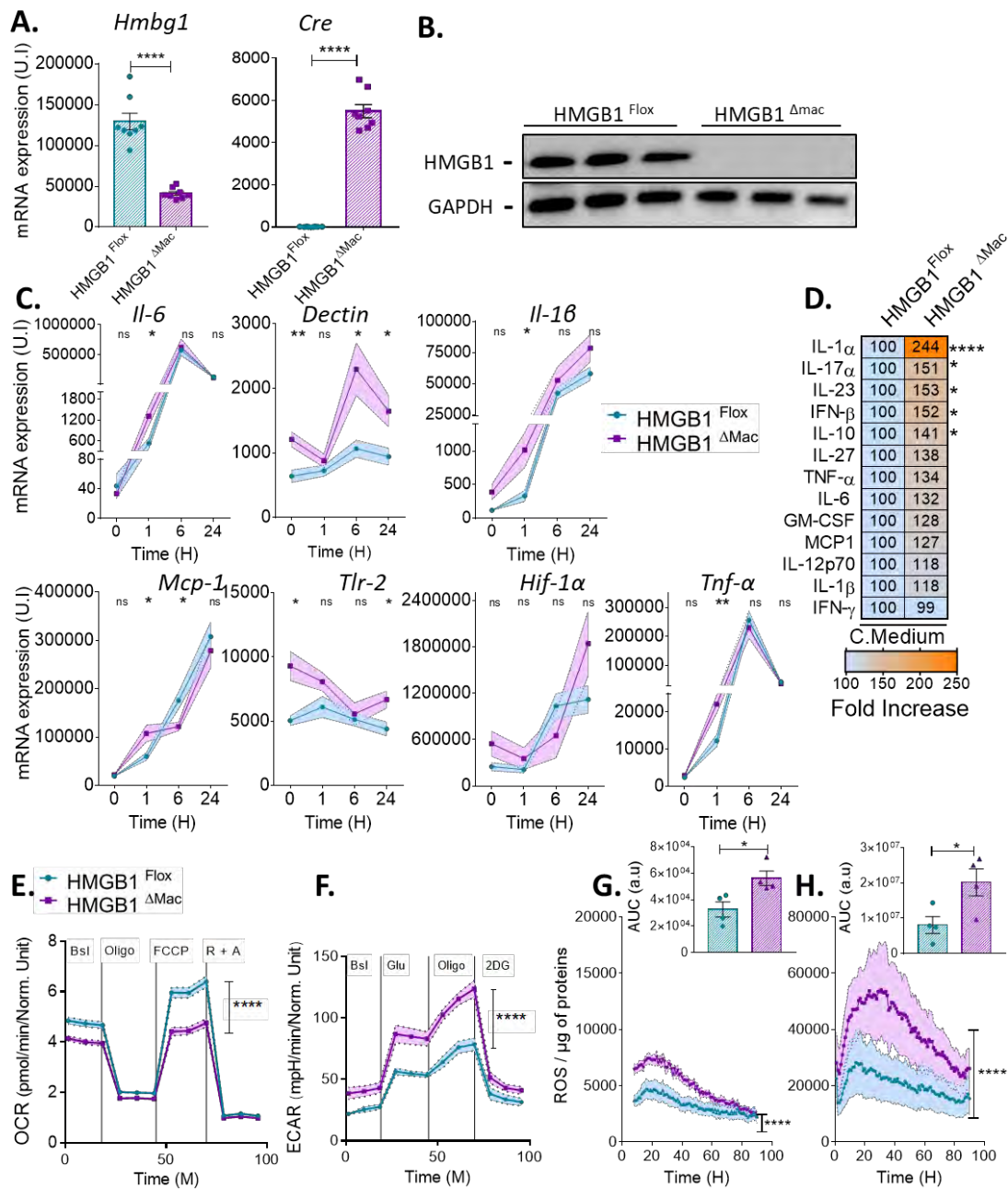
## ***Effet nucléaire/chromatinien d'HMGB1***

Si à l'état M0, HMGB1 n'est pas exporté dans le cytoplasme et reste dans le noyau, ceci suggère que ses effets anti-inflammatoires sont médiés par sa localisation nucléaire. HMGB1 a d'abord été identifié comme une protéine pouvant interagir avec l'ADN, capable de régir sa conformation 3D et son état de compaction (Kang et al. 2014). Tout récemment, notre équipe a pu montrer qu'HMGB1 était capable, dans une tout autre cellule (l'hépatocyte), de réguler l'activité du FdT LXR et PPAR $\gamma$  via l'occupation de l'ADN, notamment autour des TSS (Transcription Starting Sites) (Personnaz et al. 2021). D'autres équipes ont pu montrer des effets similaires sur des cultures primaires de cellules sénescences où HMGB1 pouvait réguler des programmes transcriptionnels pro-sénescence en jouant notamment sur la conformation de l'ADN (Sofiadis et al. 2019). Dans ce contexte et en collaboration avec le laboratoire du Pr. Argyris Papantonis (Université de Gottingen, Allemagne), nous développons une approche d'immunoprécipitation de Chromatine couplée à du séquençage haut-débit (ChIP-seq) sur des BMDM HMGB1<sup>Flx</sup> à l'état M0 et M1. L'analyse bioinformatique des zones de l'ADN occupé différemment par HMGB1 permettra de disséquer le type de mécanisme moléculaire que régule HMGB1 à l'état M0 et M1. Il sera particulièrement intéressant d'évaluer la liaison d'HMGB1 aux séquences promotrices des gènes dépendants de KLF4, NF-kB ou Nkx2-5, qui sont des FdT identifiés par l'analyse de motifs sur les DEG issus de l'analyse du séquençage d'ARN (**Figure 2J-K**). Compte tenu de la régulation forte, et inattendue, que semble exercer HMGB1 sur la physiologie du lysosome (**Figure 2D-I**), nous regarderons aussi l'occupation d'HMGB1 sur des zones dépendantes des facteurs de transcriptions impliqués dans la biogénèse des lysosomes comme TFEB (Peña-Llopis et al. 2011; Settembre et al. 2011). D'autres approches complémentaires pourront être aussi envisagées pour étudier notamment la dynamique chromatinienne en l'absence d'HMGB1. Des expériences de Ch-IPseq visant les histones H3K27me3 (chromatine fermée) ou H3K27ac (chromatine ouverte) ou d'autres approches comme l'Assay for Transposase-Accessible Chromatin couplé au séquençage haut-débit (ATACseq) sont actuellement à l'étude.

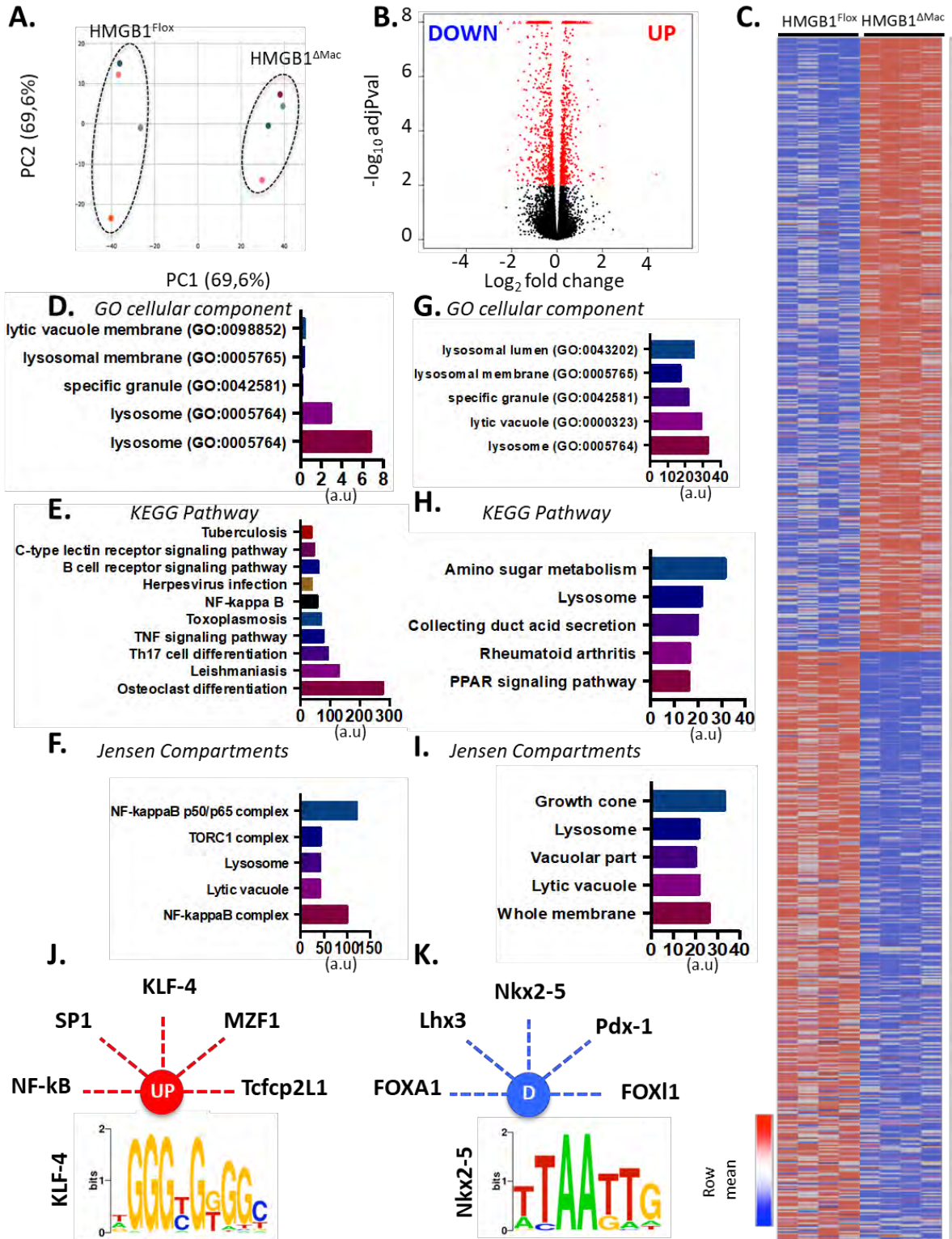
## ***Polarisation du macrophage et fonction lysosomale***

Dans le macrophage naïf (M0) l'absence d'HMGB1 induit une orientation des macrophages vers un profil M1. Les analyses bioinformatiques ont pu montrer que la signature transcriptomique des M0 HMGB1 $\Delta$ Mac convergait vers celle des BMDM sauvages polarisés M1 par traitement au LPS et à l'IFN $\gamma$  (GSE000103759) (**Figure Supplémentaire 3A-B**). Les BMDM M0 HMGB1 $\Delta$ Mac présentent déjà à l'état naïf un niveau d'activation sur le plan transcriptomique mais aussi fonctionnel puisque la production de ROS est déjà augmentée (**Figure 1G-H**). Il est aussi intéressant de noter que les M0 HMGB1 $\Delta$ Mac ressemblent aux macrophages M1, plus par les gènes sous-exprimés que ceux surexprimés (diagramme de Venn **Figure Supplémentaire 3B**). La principale fonction biologique en lien avec les gènes sous-exprimés concerne la machinerie lysosomale (**Figure 2&3**). Le lysosome joue un rôle prépondérant dans la fonction du macrophage, et comme évoqué dans l'introduction de cette thèse, chez le macrophage, cet organelle est important pour la polarisation M1 et M2. La fonction cruciale du lysosome, et notamment son acidification, peut être très différente en fonction du profil du macrophage. Le pH du phagolysosome du M2 est très acide, alors que pH du phagosome M1 est plutôt basique (Canton et al. 2014). De façon très schématique, basée sur les données de la littérature, la fonction lysosomale du M1, en lien avec son activité de « tueur » (bactéricide, virucide et fongicide) doit être très fugace et explosive, alors que l'activité du macrophage M2 se focalise d'avantage sur la phagocytose des cellules apoptotiques ou débris en tout genre (appelée efférocystose) et nécessite plus de temps. Ces mécanismes d'efférocystose sont décrits comme essentiels chez le macrophage M2, et indispensables dans la résolution de l'inflammation. L'invalidation *in vivo* des acteurs clés de l'efférocystose, oriente le macrophage vers un profil M1, favorisant la progression de pathologies inflammatoires (Cai et al. 2020; Y. Zhou et al. 2020). La modification des propriétés du lysosome pourrait donc contribuer au phénotype inflammatoire des macrophages HMGB1 $\Delta$ Mac.

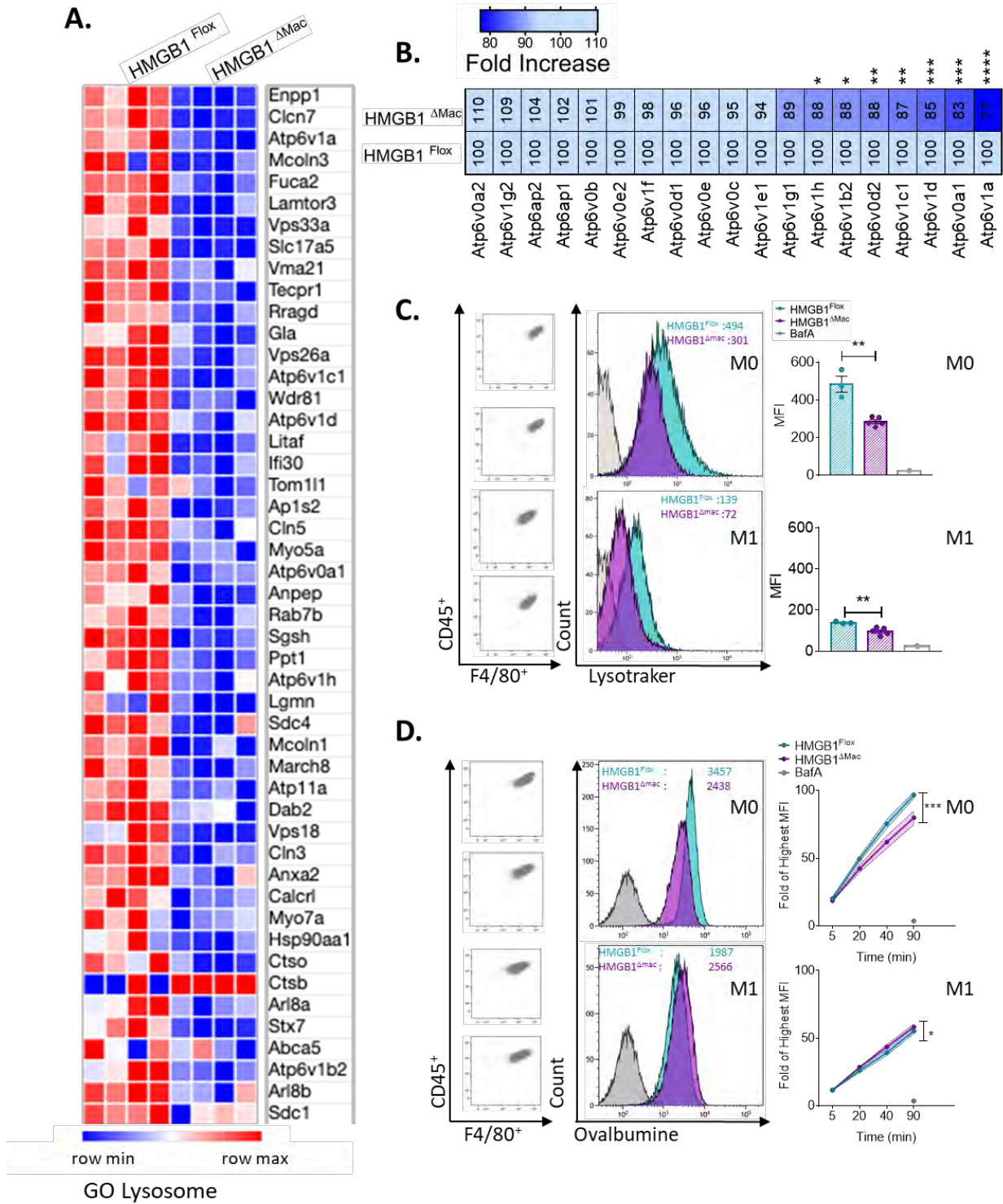
Dans le contexte du macrophage, le lysosome joue aussi un rôle important dans la maturation et digestion du phagosome après sa liaison, notamment à l'aide de la sous unité de la v-ATPase (ATP6V0D2) (Xia et al. 2019). Les acides aminés et autres nutriments rendus disponibles à l'intérieur de la lumière lysosomale, après digestion protéolytique (à l'aide de protéases dont l'activité nécessite un pH acide) sont recensés par toute la machinerie mTORC1 (Ballabio et Bonifacino 2020; Condon et Sabatini 2019). De nombreux articles rapportent que l'activité de la signalisation mTOR influence la polarisation des macrophages et est cruciale pour initier la polarisation M2 (Hayama et al. 2018; Byles et al. 2013; Hallowell et al. 2017; Kimura et al. 2016). En effet, les invalidations de *Lamtor1*, *Rictor* ou *Tsc* conduisent à une translocation du facteur de transcription TFEB ou TFE3 dans le noyau, connu pour entraîner une polarisation de type M1 (Hayama et al. 2018; Pastore et al. 2016). TFEB pourra alors initier un programme transcriptionnel complexe avec notamment la promotion de l'expression de gènes (i) de la biogenèse du phagosome et du lysosome, important pour générer assez de membrane pour éliminer les pathogènes et (ii) de l'inflammation comme les cytokines inflammatoires IL-6 ou TNF- $\alpha$  qui vont pouvoir alerter d'autres cellules du système immunitaire (Hayama et al. 2018). Il est important de noter que la plupart des souches de souris invalidées pour la voie mTOR (*Lamtor1*<sup>ΔMac</sup>, *Rictor*<sup>ΔMac</sup> ou *Tsc*<sup>ΔMac</sup>) présentent une hypersensibilité au choc infectieux conduisant aux décès des animaux par une polarisation exacerbée des macrophages vers le profil M1 (Byles et al. 2013; Hallowell et al. 2017; Kimura et al. 2016). Des expériences sont actuellement en cours pour déterminer le lien entre la présence d'HMGB1 et l'activité de la voie mTOR et des voies de signalisation en aval, comme la translocation nucléaire du FdT TFEB notamment. Dans ce cas aussi, la fonction modifiée de la machinerie du lysosome pourrait être déterminante dans l'orientation des macrophages HMGB1<sup>ΔMac</sup>.



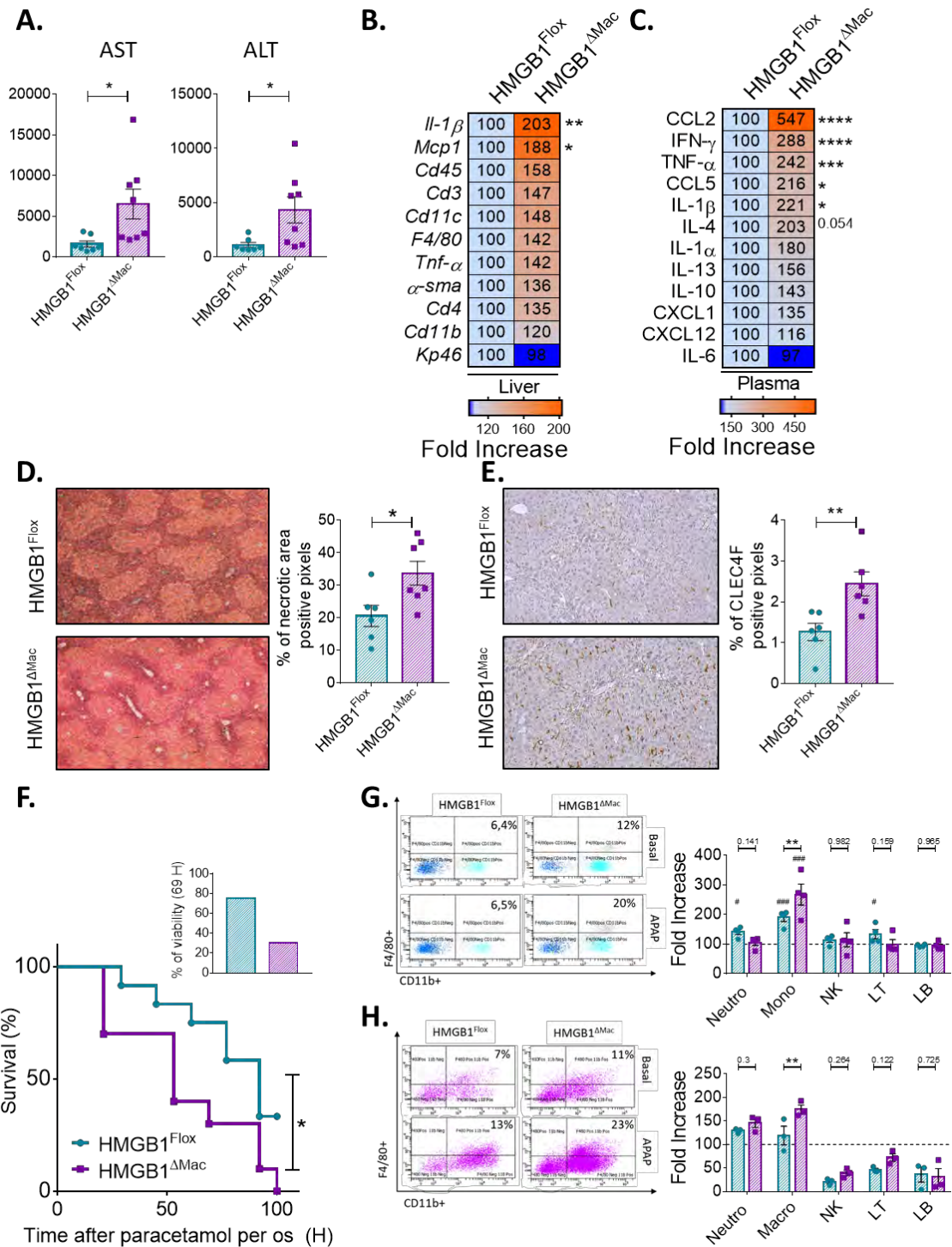
**Figure 1: HMGB1 $\Delta$ Mac BMDM exhibits an inflammatory phenotype *in vitro* :** (A) Expression en ARNm d'*Hmgb1* et de la *Cre* recombinase dans les BMDM de souris *HMGB1<sup>Flox</sup>* et *HMGB1<sup>ΔMac</sup>*. (B) Immunoblot représentatif ciblant HMGB1 et GAPDH dans des BMDM de souris *HMGB1<sup>Flox</sup>* et *HMGB1<sup>ΔMac</sup>*. (C) Expression en ARNm des marqueurs de l'inflammation après une stimulation avec du LPS (10 ng/mL) et INF $\gamma$  (40 ng/ml) dans les BMDM de souris *HMGB1<sup>Flox</sup>* et *HMGB1<sup>ΔMac</sup>* au cours du temps sur 24 heures. (D) Quantification des cytokines libérées par les BMDM de souris *HMGB1<sup>Flox</sup>* et *HMGB1<sup>ΔMac</sup>* après 24 heures de polarisation M1 induite par LPS (10 ng/mL) et INF $\gamma$  (40 ng/ml) (E-F) BMDM en culture dans des plaques de Seahorse, lors de l'analyse des flux extracellulaire, les BMDM sont traités avec (E) oligomycine (Oligo), FCCP, puis de la roténone (R) et de l'antimycine A (A), afin d'obtenir l'expression des OXPHOS à partir des paramètres de l'OCR (oxygen consumption rate) (F) avec du glucose (Glu), de l'oligomycine (Oligo), et du 2-deoxyglucose (2DG) afin de déterminer l'activité de glycolyse à partir des paramètres de l'ECAR (extracellulaire acidification rate). (G-H) Production de ROS par des BMDM de souris *HMGB1<sup>Flox</sup>* et *HMGB1<sup>ΔMac</sup>* en condition M0 (G) ou M1 (H). Les données sont moyennées  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . n = 4 (F-H) ou plus (A,C,D,E) *HMGB1<sup>Flox</sup>* et n = 4 (F-H) ou plus (A,C,D,E) *HMGB1<sup>ΔMac</sup>* sont comparés entre eux par un test de Mann and Whitney (A), ou des multi t-test (C-D), ou par un two-way ANOVA (E-H).



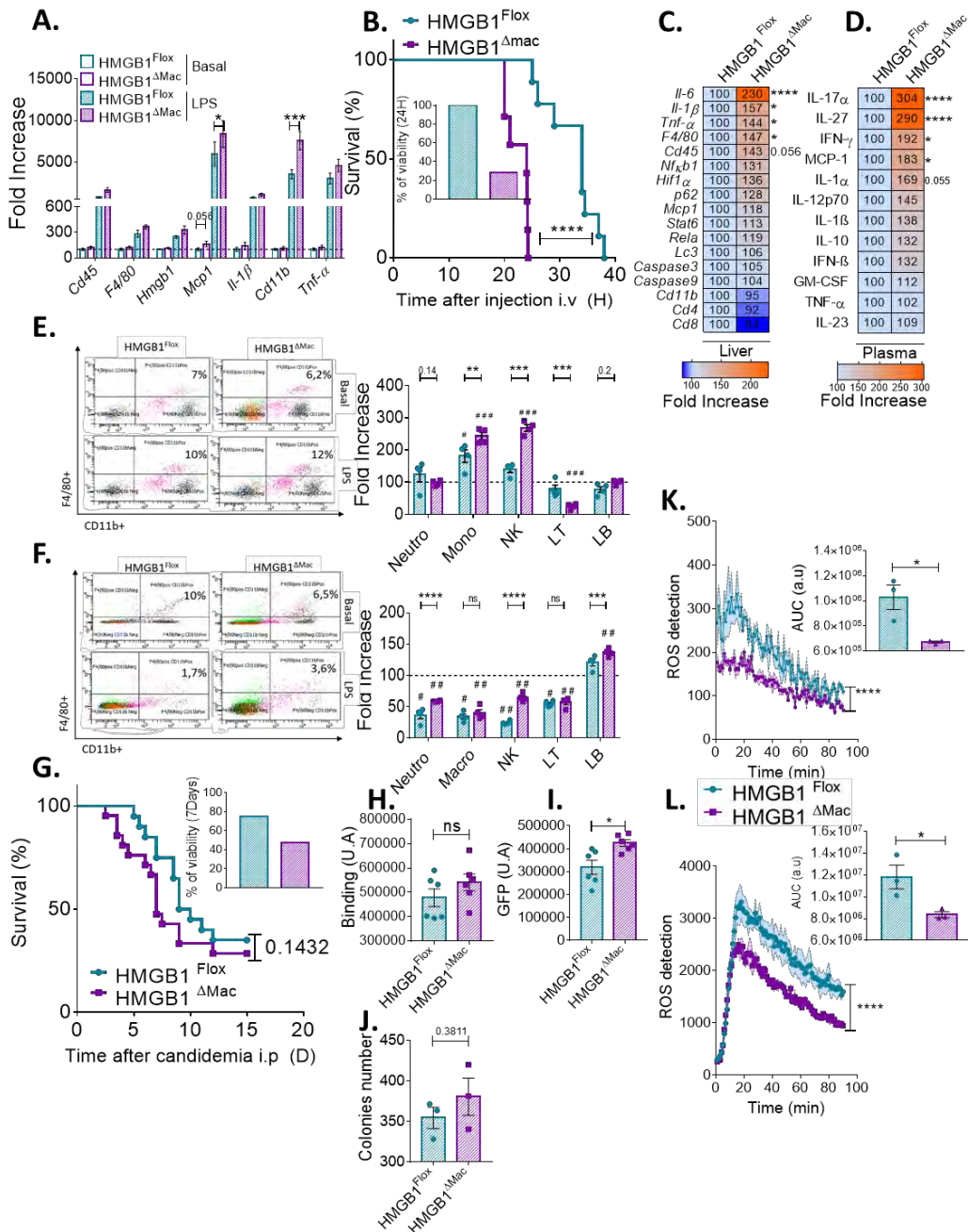
**Figure 2 : RNA-seq analysis reveals a lysosomal dysfunction in  $HMGB1^{\Delta Mac}$  BMDM :** (A) Représentation en PC (Composante principale) de la signature transcriptionnelle des BMDM de souris  $HMGB1^{Fllox}$  et  $HMGB1^{\Delta Mac}$  en M0. (B) Représentation en volcano plot du différentiel d'expression génique entre les BMDM  $HMGB1^{Fllox}$  et  $HMGB1^{\Delta Mac}$ . (C) Clusterisation non supervisée représentée en Heatmap illustrant le différentiel d'expression d'ARNm entre les BMDM de souris  $HMGB1^{Fllox}$  et  $HMGB1^{\Delta Mac}$  en bleu les DEG-DOWN et en rouge les DEG-UP. (D, E, F) Graph bar représentant les composants cellulaires (D), les voies métaboliques de KEGG (E), et compartiments Jensen (F) pour les gènes DEG-UP (G, H, I) Graph bar représentant les composants cellulaires (G), les voies métaboliques de KEGG (H), et compartiments Jensen (I) pour les gènes DEG-DOWN. (J-K) Identification par l'analyse des motifs des DEG-UP (J) et des DEG-down (K) du Top 5 des FdT et du motif du FdT le plus représenté.



**Figure 3 : Macrophage specific-deletion of *Hmgbl* induces an ineffective acidification and a reduced function of the lysosomal compartment:** (A) Heatmap représentant le différentiel d'expression des ARNm retrouvé dans le GO « Lysosome » entre les BMDM de HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup>. (B) Heatmap représentant le différentiel d'expression des ARNm codant pour les différentes sous-unités de la pompe à proton vacuolaire (v-ATPase) lysosomale entre les BMDM de souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup>. (C-D) Quantification par cytométrie en flux de l'intensité médiane de fluorescence (MFI) du Lysotraker (C) ou de l'Ovalbumine (D) chez des BMDM (CD45<sup>+</sup> et F4/80<sup>+</sup>) de souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> à l'état M0 et polarisés M1. Les données sont moyennées ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. n = 3 ou plus (B,C,D) HMGB1<sup>Fllox</sup> et n = 4 ou plus (B,C,D) HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés entre eux par un test de Mann and Whitney (C), ou des multi t-test (B), ou par un two-way ANOVA (D).

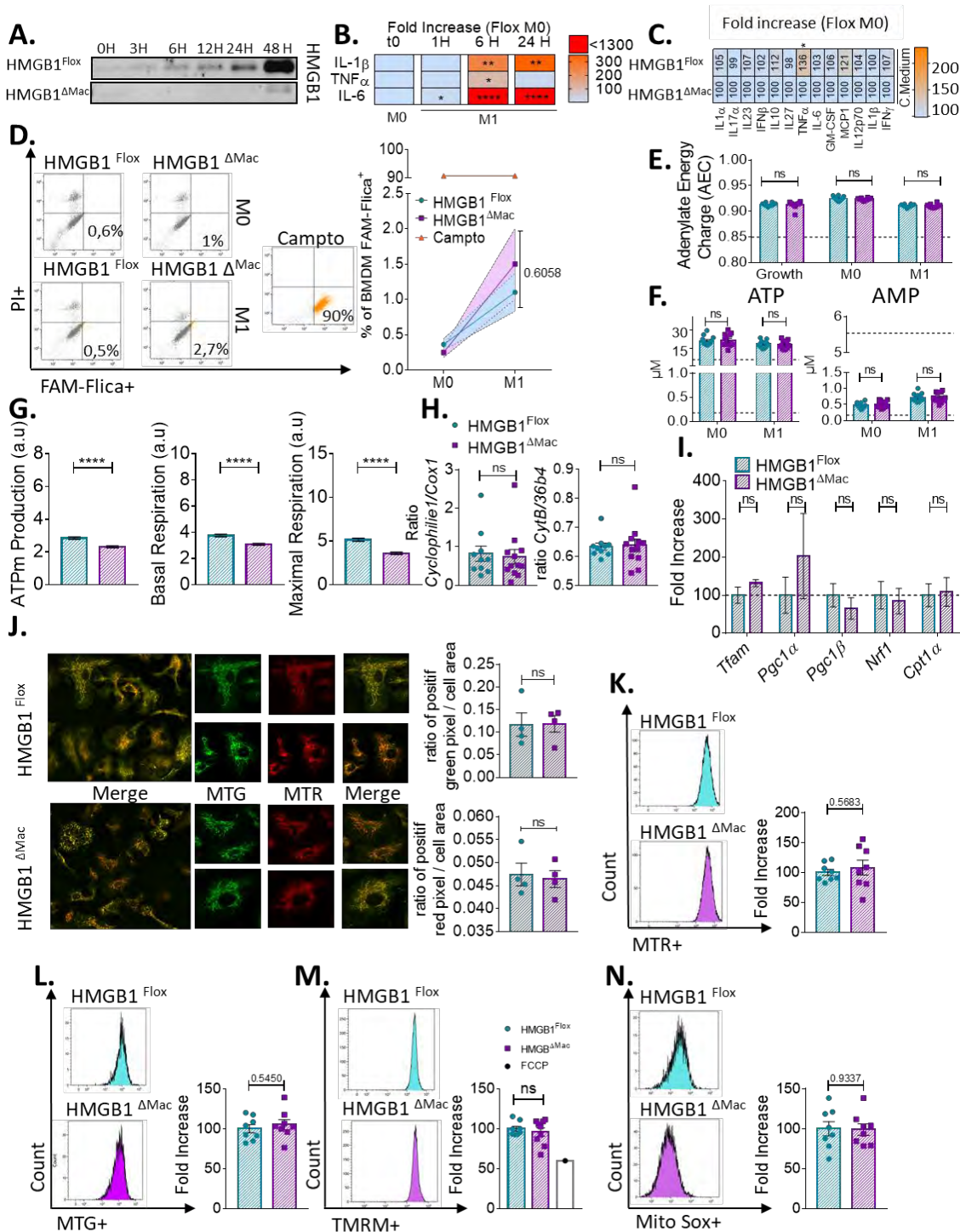


**Figure 4 : HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice display increased inflammatory response and mortality during sterile inflammation :** (A) Dosage plasmatique des ALT et AST chez des souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après administration de CCL<sub>4</sub>. (B) Quantification des ARNm issue du lobe médian du foie de souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après administration de CCL<sub>4</sub>. (C) Quantification des cytokines plasmatiques des souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après administration de CCL<sub>4</sub>. (D) Quantification des zones de nécrose hépatique par une coloration à l'hématoxyline/éosine de coupe de foie issue de souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 36 heures après administration de CCL<sub>4</sub>. (E) Quantification des cellules de Kupffer par immunohistochimie contre la protéine CLEC4F sur des coupes de foie issues de souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 36 heures après administration CCL<sub>4</sub>. (F) Courbe de survie d'animaux HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> après administration d'une dose létale de paracétamol (500 mg/kg, *per os*). (G) Quantification des différentes populations immunes circulantes de souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après une administration de paracétamol (300 mg/kg). (H) Quantification des différentes populations immunes de la fraction stromal du foie de souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après une administration de paracétamol (300 mg/kg). Les données sont moyennées ± SEM. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001, \*\*\*\**p*<0.0001. *n* = 4 ou plus HMGB1<sup>Fllox</sup> et *n* = 4 ou plus HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés entre eux par un test de Mann and Whitney (A,D,E), ou des multi t-test (B,C,G,H), ou par un Mantel-Cox test (F). Les données sont moyennées ± SEM. #*p*<0.05, ##*p*<0.01, ###*p*<0.001, ####*p*<0.0001. *n* = 4 HMGB1<sup>Fllox</sup> et *n* = 4 HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés entre la condition basale et la condition traitée par des multi t-test au sein de chaque génotype (G,H).

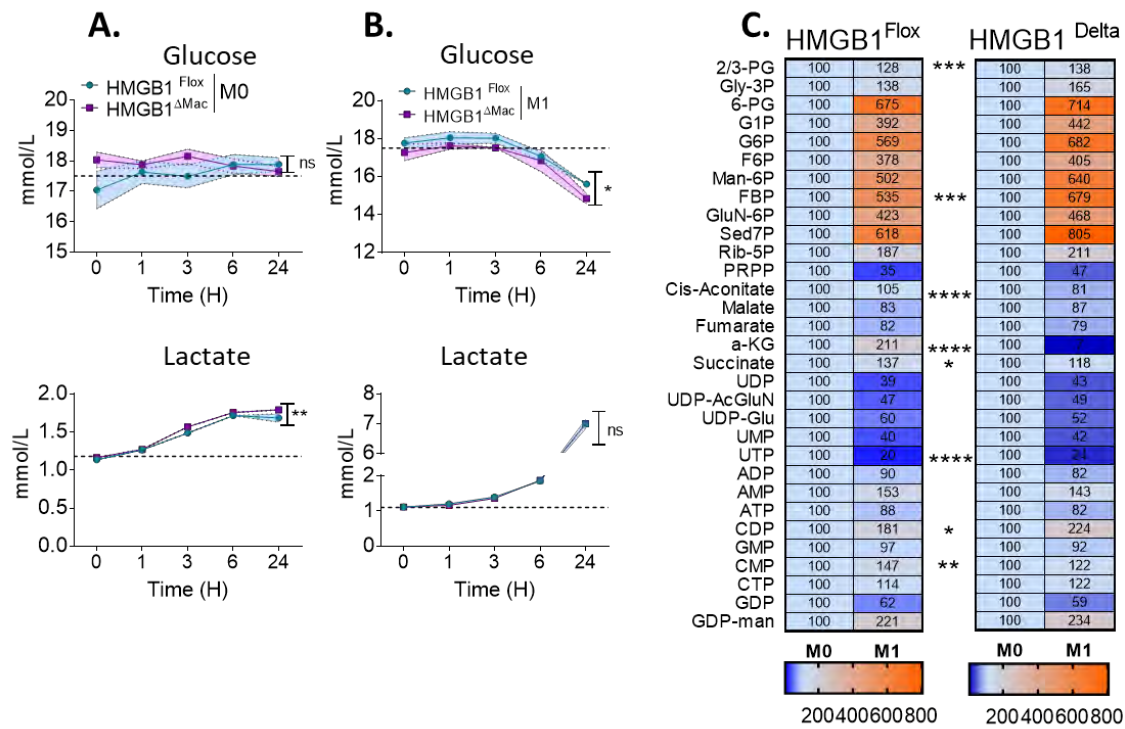


**Figure 5 : HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice exhibit an exaggerated inflammatory response leading to death after septic shock or peritoneal candidosis :** (A) Expression des ARNm marqueurs de l'infiltrat et de l'inflammation chez des souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en condition basale, ou 16 heures après injection d'une faible dose de LPS (1 mg/kg). (B) Courbe de survie d'animaux HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> après injection d'une dose létale de LPS (17.5 mg/kg en intraveineuse). (C) Quantification des ARNm issus du lobe médian du foie de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après injection de LPS (17.5 mg/kg). (D) Quantification des cytokines dans le plasma de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après injection de LPS (17.5 mg/kg). (E) Quantification des différentes populations immunes circulantes de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après une injection de LPS (17.5 mg/kg). (F) Quantification des différentes populations immunes de la rate de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 16 heures après une injection de LPS (17.5 mg/kg). (G) Courbe de survie d'animaux HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> après injection d'une dose létale de *C. Albicans* (100\*10<sup>8</sup> blastospores par souris). (H) Histogramme représentant la capacité de liaison des pMACs de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> à *C. Albicans* in vitro. (I) Histogramme représentant la capacité de protéolyse des pMACs de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> à *C. Albicans-GFP* in vitro. (J) Histogramme représentant la capacité fongicide des pMACs de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> à *C. Albicans-GFP* in vitro. (K-L) Production de ROS par des pMACs de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en condition M0 (K) ou en présence de *C. Albicans* (L). Les données sont moyennées ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. n = 3 ou plus HMGB1<sup>Flox</sup> et n = 3 ou plus HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés entre eux dans la condition traitée par un test de Mann and Whitney (H,I,J,K,L), ou des multi t-test (A,C,D,E,F), ou par un Mantel-Cox test (B,G). Les données sont moyennées ± SEM. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, ####p<0.0001. n = 4 HMGB1<sup>Flox</sup> et n = 4 HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés entre la condition basale et la condition traitée par des multi t-test au sein de chaque génotype (E,F).

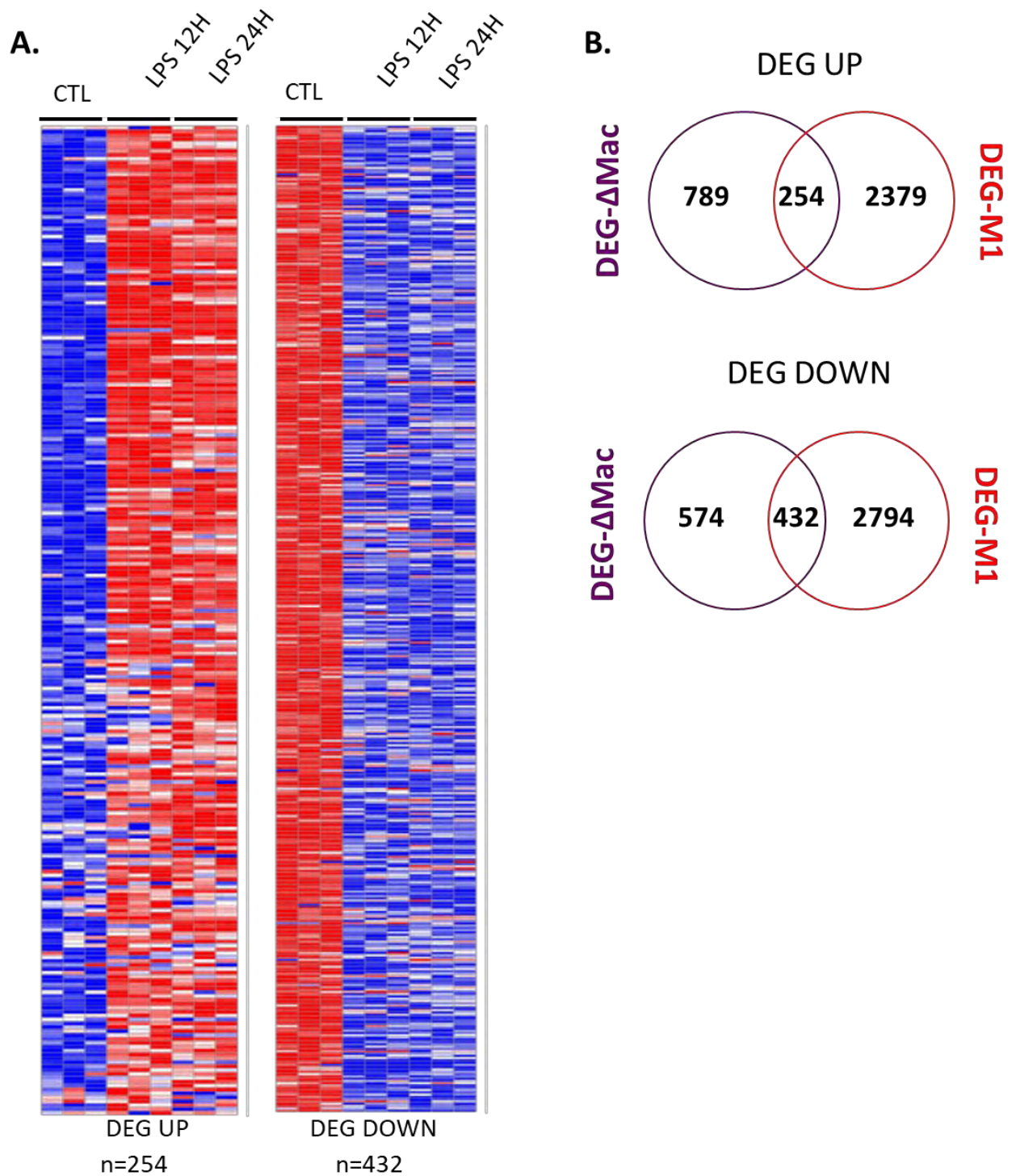




**Suppl Fig 1 : HMGB1<sup>ΔMac</sup> BMDM have a reduced OXPHOS and no difference in chondriome :** (A) Immunoblot représentatif ciblant HMGB1 dans du milieu conditionné de BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en condition M1. (B) Quantification des ARNm des marqueurs de l'inflammation chez des BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> au cours de la polarisation M1 par rapport aux HMGB1<sup>Flox</sup> en M0. (C) Quantification des cytokines issue du milieu conditionné de BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> 24 heures à l'état de M0. (D) Quantification en cytométrie en flux du pourcentage d'apoptose (par la sonde FAM Flixa) chez des BMDM (CD45+ et F4/80+) de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en M0 et en M1 (24 heures). (E) Représentation de la charge adénylique des BMDM en culture. (F) Quantification en spectrométrie de masse de l'ATP et AMP dans des BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en M0 et en M1 (24 heures). (G) Histogramme représentant la production d'ATP mitochondriale (Gauche), la respiration basale (Centre) et la capacité maximale de respiration (Droite) par une approche de seahorse (OCR) sur des BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en condition M0. (H) Quantifications de la quantité d'ADN mitochondriale par rapport à la quantité d'ADN nucléaire (I) Quantification des ARNm marqueurs de la mitochondriogénèse entre des BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en condition M0. (J) Microscopie confocale et quantification du réseau mitochondrial de BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en condition M0 avec du MTG (Mitotracker Green) et du MTR (Mitotracker Red). (K-N) Quantification en cytométrie en flux de l'intensité médiane de fluorescence (FMI) des Mitotracker Red (K), du Mitotracker Green (L), du TMRM reflet du potentiel de membrane (M) ou de la sonde MitoSox reflet du stress oxydant (N) chez des BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en M0. Les données sont moyennées  $\pm$  SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. n = 4 ou plus HMGB1<sup>Flox</sup> et n = 4 ou plus HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés par un test de Mann and Whitney (D,E,G,H,I-N), ou des multi t-test (B,C,F).

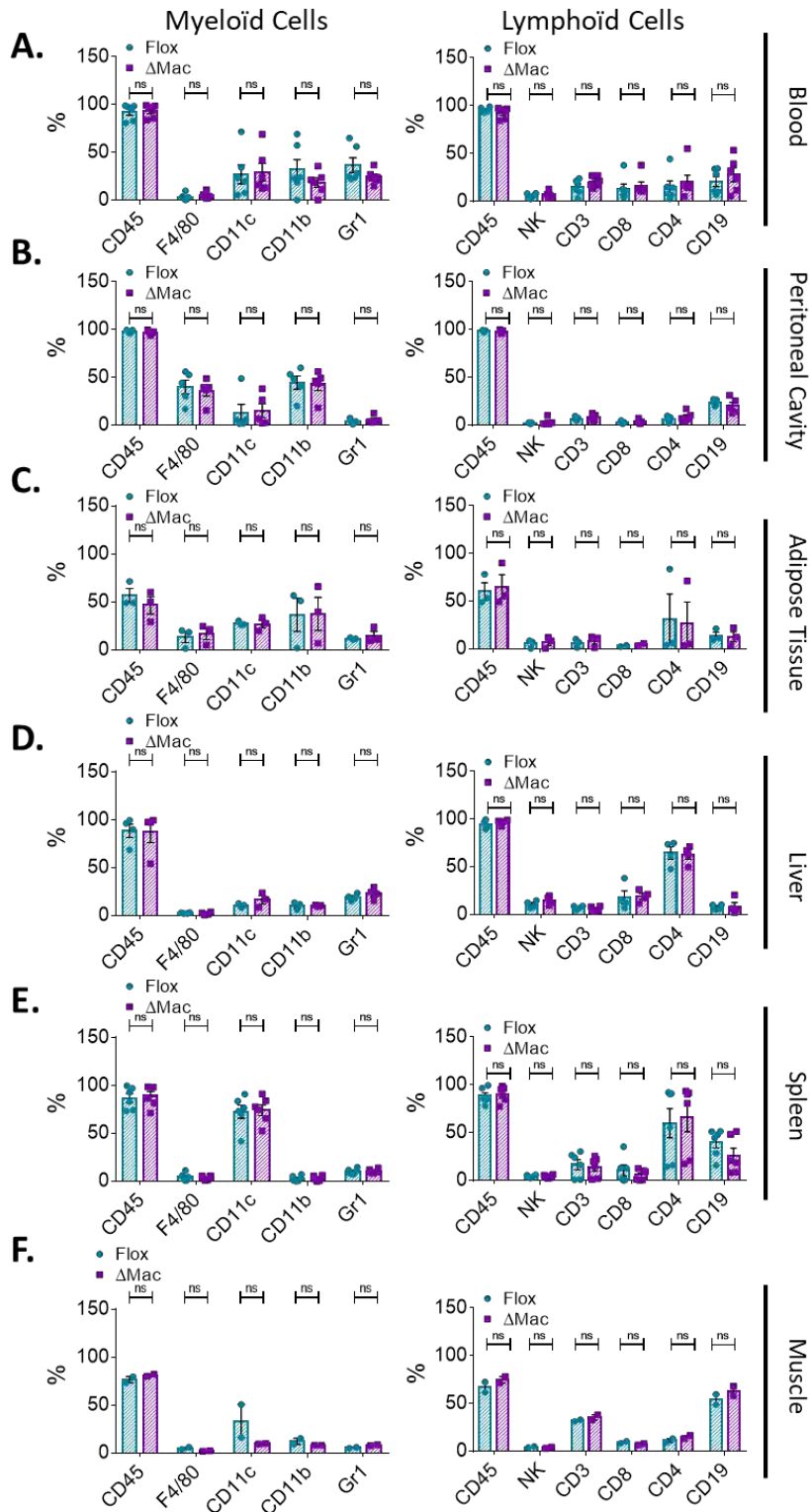


**Suppl Fig 2 : HMGB1<sup>ΔMac</sup> BMDM are more glycolytic :** (A-B) Courbes au cours du temps de la consommation de glucose (Haut) et de la production de lactate (Bas) chez des BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en M0 (24 heures) (A) et en M1 (24 heure) (B). (C) Heatmaps de la quantité de métabolites intracellulaires entre des BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en M0 ou M1 (24 heures). Les données sont moyennées ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. n = 3 ou plus HMGB1<sup>Flox</sup> et n = 3 ou plus HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés entre eux par des multi t-test (C), ou par un two-way ANOVA (A,B).

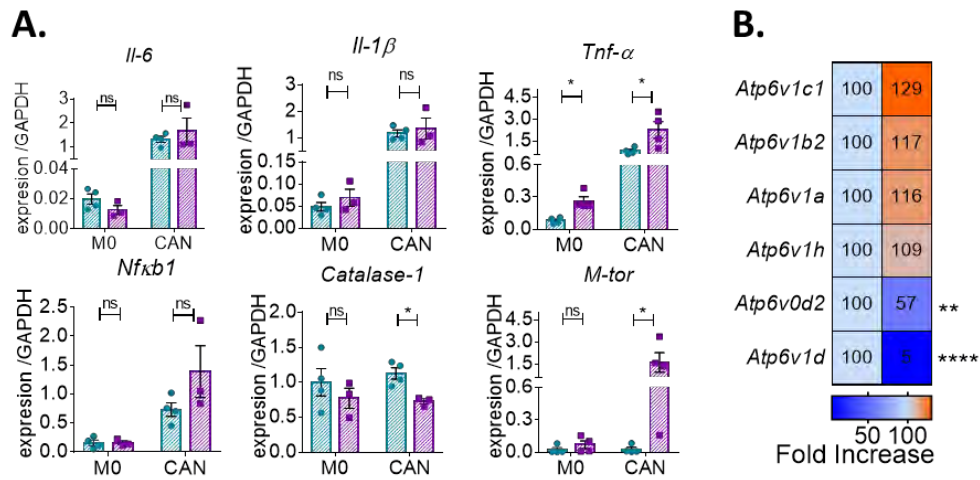


**Suppl Fig 3: Comparison of transcriptomic signature between HMGB1 $\Delta$ Mac BMDM and LPS/IFN $\gamma$ -activated BMDM :** (A) Heatmaps représentant les DEGs identifiés chez les BMDM HMGB1 $\Delta$ Mac dans l'activation des BMDM en M1 (LPS 12 heures) ou (LPS 24 heures). (B) Diagramme de Venn représentant la superposition des gènes up régulés en M1 et chez le HMGB1 $\Delta$ Mac en M0 (Haut) ou la superposition des gènes down régulés en M1 et chez le HMGB1 $\Delta$ Mac en M0 (Bas).





**Suppl Fig 5: Characterization of immune cell populations in HMGB1<sup>Fllox</sup> and HMGB1<sup>ΔMac</sup> mice :** (A-F) Quantification des différentes populations immunes sanguines (A), de la cavité péritonéale (B), de la fraction stromale du tissu adipeux (C), de la fraction stromale du foie (D), de la fraction stromale de la rate (E) et de la fraction stromale du muscle (F) de souris HMGB1<sup>Fllox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en condition basale. Données exprimées en fold des BMDM HMGB1<sup>Fllox</sup> en M0. Les données sont moyennées ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. n = 2 ou plus HMGB1<sup>Fllox</sup> et n = 2 ou plus HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés par des multi t-test (A-F)



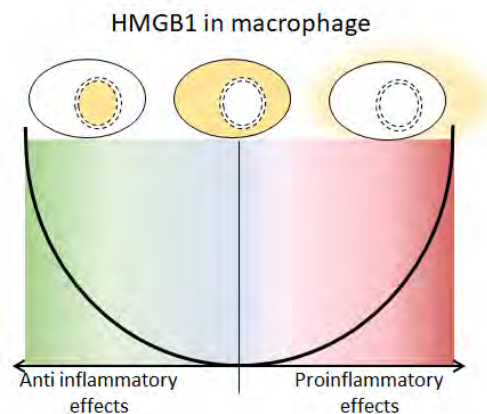
**Suppl Fig 6 : Inflammatory and lysosome phenotype in HMGB1<sup>Δmac</sup> BMDM treated with *C. albicans* :** (A) Expression génique des marqueurs inflammatoires des pMACs isolés des souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en M0 ou après une stimulation par *C. albicans* (4 heures) *in vitro*. (B) Heatmap représentant le différentiel d'expression des sous-unités de la v-ATPase chez des pMACs isolés de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en M0. Les données sont moyennées ± SEM. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. n = 3 ou plus HMGB1<sup>Flox</sup> et n = 3 ou plus HMGB1<sup>ΔMac</sup> sont comparés par un test de Mann and Whitney (A), ou des multi t-test (B).

## DISCUSSION

### **I/ Qu'est-ce qui induit le profil pro-inflammatoire du HMGB1<sup>ΔMac</sup> ?**

Les données de la littérature comme nos données suggèrent que la localisation subcellulaire d'HMGB1 influence la fonction d'une cellule. Dans le macrophage, à l'état naïf, HMGB1 est nucléaire, par son rôle dans la chromatine, il réprime activement l'inflammation et améliore l'activité protéolytique du macrophage (Article 2). Dans la physiologie, suite à un challenge inflammatoire, le système immunitaire inné doit répondre rapidement, intensément, résoudre l'inflammation et revenir à un état basal non inflammatoire. L'intensité de la réponse inflammatoire est induite par les cytokines, et par la relocalisation d'HMGB1 dans le cytoplasme puis, hors de la cellule. En extracellulaire, il est un puissant adjuvant de l'inflammation. HMGB1, dans le macrophage, pourrait donc être un rhéostat de l'inflammation en fonction de sa localisation.

Nous posons l'hypothèse que l'absence d'HMGB1 induit un remodelage du paysage chromatinien, générant de nombreux changements d'expression génique, entraînant le macrophage vers une polarisation pro-inflammatoire de type M1. (Personnaz et al. 2021; Sofiadis et al. 2019).



**Figure 44: Graphique représentant les rôles antagonistes d'HMGB1 en fonction de sa localisation subcellulaire.** Nos recherches suggèrent qu'HMGB1 dans le macrophage participe au maintien du profil "naïf". Ce qui permet une plus grande amplitude de réponse lorsque le macrophage doit s'activer et déclencher une réaction inflammatoire.

### ***Le facteur de transcription TFEB :***

Nous avons montré dans nos recherches qu'HMGB1 favorise l'activité protéolytique des macrophages (Article 2-Figure 3D) en améliorant l'activité de la v-ATPase et acidifie les lysosomes du macrophage (Article 2- Figure 3C). HMGB1 influence et réduit dès le M0 le transcriptome en lien avec la biogenèse lysosomale (Article 2- Figure 3A). Si grâce au Ch-IPseq, on prouve qu'HMGB1 est présent sur les séquences promotrices des gènes sous-exprimés chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup> (Article 2- Figure 3A), nous pourrions conclure qu'HMGB1 participe activement à leur transcription. Nous pourrions également mesurer chez le HMGB1<sup>Flox</sup>, l'enrichissement en HMGB1 au niveau des séquences promotrices des gènes cibles du FdT TFEB, impliqué dans la biogenèse des lysosomes. Si l'on identifie parmi les DEG DOWN chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup>, des gènes ciblés également par TFEB, on pourra conclure qu'HMGB1 en association avec TFEB participe à leur transcription. De plus, nous pourrions mesurer chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup> M0, la translocation du facteur TFEB dans le noyau par rapport à des HMGB1<sup>Flox</sup> en M0. Si HMGB1 favorise la transcription des gènes cibles de TFEB, nous devrions observer, en l'absence d'HMGB1, une augmentation de la présence de TFEB dans le noyau. TFEB au cours de l'inflammation dans les macrophages entraîne la biogenèse des lysosomes et la sécrétion accrue de TNF $\alpha$  et d'IL-6 (Hayama et al. 2018; Pastore et al. 2016).

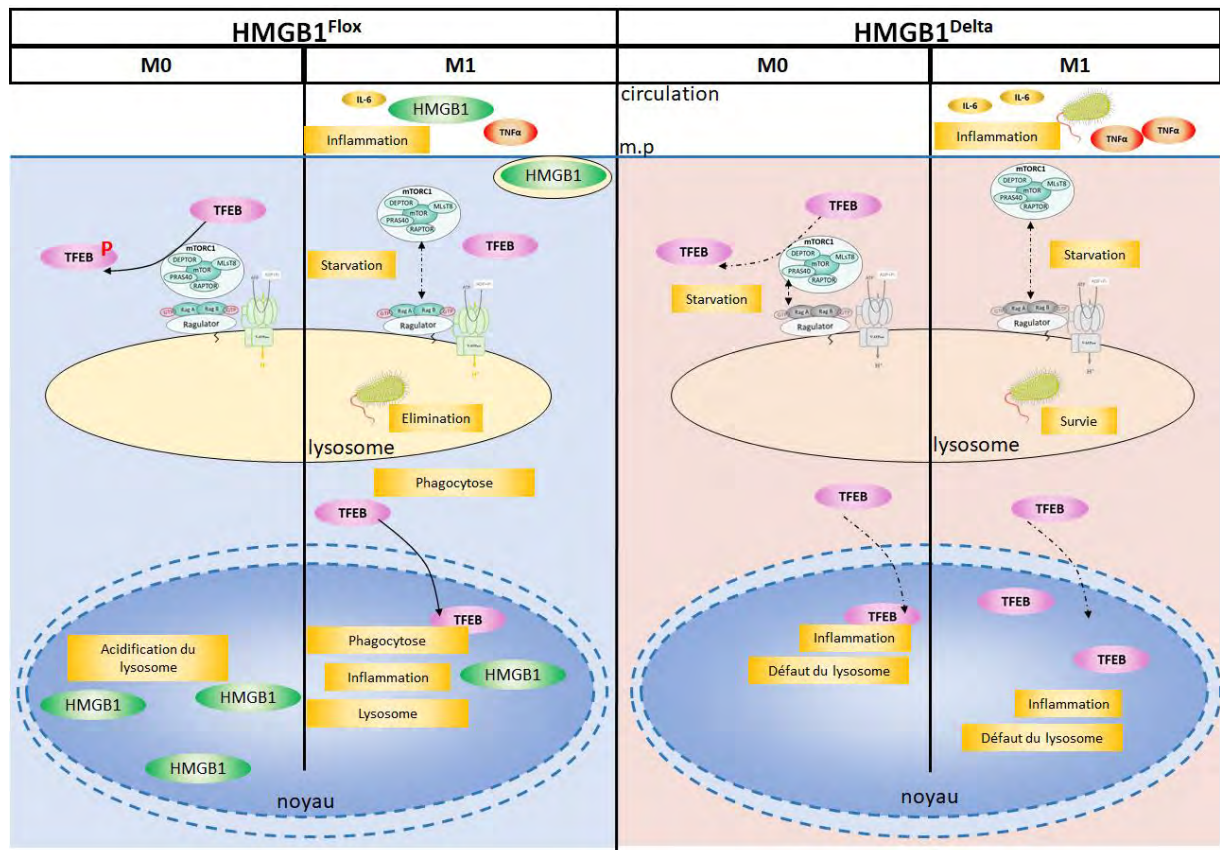
Donc, si TFEB est davantage présent dans les noyaux des HMGB1<sup>ΔMac</sup> que dans ceux des HMGB1<sup>Flx</sup>, ceci consoliderait notre hypothèse selon laquelle : l'absence d'HMGB1 rend la chromatine des macrophages plus compatible à la transcription des gènes de l'inflammation, et TFEB pourrait bien être un des FdT impliqué dans cette promotion.

La localisation de TFEB est en partie dépendante de l'activité de mTORC1 (Hayama et al. 2018). En l'absence d'ancrage au lysosome, mTORC1 est inactif et se retrouve dans le cytoplasme (Sancak et al. 2010). L'inactivation de mTORC1 entraîne une accumulation massive de TFEB et TFE3 dans le noyau ce qui stimule la biogenèse des lysosomes et la synthèse des cytokines inflammatoires (Hayama et al. 2018); (Mercuri et al. 2013). A l'inverse, l'activation du complexe mTORC1 est essentielle pour la polarisation M2 (Kimura et al. 2016). D'autres recherches faites chez la souris et sur du sang humain, confirme qu'un défaut d'activité de mTORC1 et donc de la physiologie des lysosomes est associé à une surinformation (N. Liu et al. 2019; B.-K. Min et al. 2019; Nakadera et al. 2016; Byles et al. 2013; Hallowell et al. 2017; Kimura et al. 2016). Chez *C.elegans*, le gène orthologue de TFEB (HLH-30) active la réponse anti-bactérienne lors d'une infection par *S. aureus* (Visvikis et al. 2014). TFEB au cours de l'évolution apparaît comme un "Master Gene" du lysosome et de la réponse innée.

Plusieurs auteurs défendent le dogme selon lequel en absence de nutriments, la cellule entre dans un état de "jeûne" qui active l'autophagie et la biogenèse des lysosomes par le FdT TFEB (Settembre et al. 2011). Cette voie biologique est détournée par les cellules myéloïdes, comme les macrophages, pour lutter contre une infection bactérienne. Les auteurs expliquent que cet état de "jeûne" cellulaire est un mécanisme ancestral de réponse face à une infection microbienne pour activer la réponse des macrophages de type M1. Plusieurs modèles d'infections bactériennes entraînent un jeûne cellulaire (dissociation du complexe mTORC1 du lysosome) (Tattoli, Philpott, et Girardin 2012). Les macrophages utiliseraient le système de détection des acides aminés, pour déclencher une réponse inflammatoire efficace et rapide contre l'infection bactérienne, en activant les voies de l'autophagie des lysosomes, de la phagocytose, et de la production de cytokines inflammatoires.

Nous pouvons envisager, qu'en l'absence d'HMGB1 dans le macrophage cet axe de "nutrient sensing" (Sancak et al. 2010; Abu-Remaileh et al. 2017) soit altéré, du fait de la diminution de l'expression et de l'efficacité de la v-ATPase (figure 3C). Cette altération de la voie permettrait la translocation de TFEB au noyau, ce qui entraîne une réaction inflammatoire et une défense anti-infectieuse (Voir Figure 45).





**Figure 45: Mécanisme possible du phénotype inflammatoire du HMGB1<sup>ΔMac</sup>.** Afin de concilier défaut du lysosome et de la machinerie du “nutrient sensing” avec la production de cytokines qui provoque, lors de l’infection, une tempête cytokinique, nous proposons ce modèle hypothétique. Le HMGB1<sup>ΔMac</sup>, en l’absence de signalisation mTOR, présenterait une activation des FdT TFEB ou TFE3, plus importante que le HMGB1<sup>Flox</sup>, ce qui aboutit à une sécrétion accrue des cytokines inflammatoires. Néanmoins, l’absence d’HMGB1, rend moins efficace l’acidification, et la phagocytose des macrophages. (Hayama et al. 2018; L. Thomas et al. 2017; Sancak et al. 2010; Pastore et al. 2016).

***D’autres facteurs de transcription comme autres pistes :***

TFEB peut constituer un candidat de choix pour expliquer notre effet biologique mais d’autres candidats sont possiblement impliqués. Parmi ceux-là figurent ceux identifiés par l’analyse RNAseq (**Figure 2J-K**), mais aussi ceux identifiés par mon équipe dans d’autres contextes biologiques.

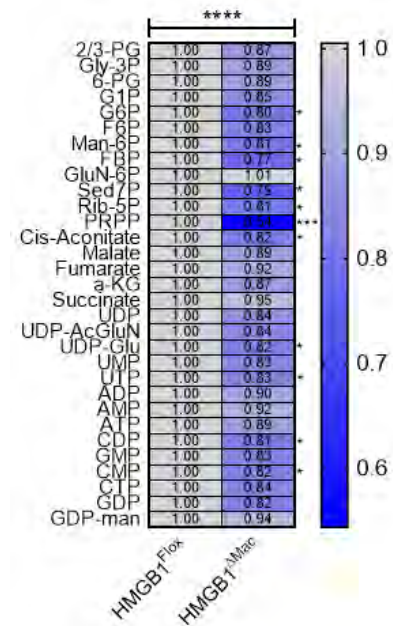
En effet, dans l’hépatocyte, un récent travail de mon équipe, auquel j’ai participé met en lumière un nouveau rôle nucléaire d’HMGB1. Il agirait comme un répresseur de la lipogenèse hépatique en condition de stress métabolique (Personnaz et al. 2021). Dans cette étude les auteurs montrent qu’HMGB1 réprime l’activité lipogénique du FdT LXRα lors d’un stress nutritionnel, dans l’hépatocyte.

Si nous transposons ce mécanisme au macrophage, on obtiendrait une répression de LXRα par HMGB1. Ce qui chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup> se traduirait par une suractivation de LXRα, qui conduirait plutôt à l’acquisition d’un phénotype M2. Hors nos données montrent tout l’inverse, ce qui exclut potentiellement tout lien entre HMGB1 et LXRα dans le macrophage, mais étaye le rôle de régulateur que peut jouer HMGB1 sur les FdT en général. Il semble donc qu’HMGB1, au lieu d’agir uniquement de pair avec LXRα, agirait plutôt avec différents FdTs.

Nous pouvons envisager que dans le macrophage HMGB1 réalise son rôle de modérateur sur les FdT pro-inflammatoires, comme NFkB, ou IRF5. Ce qui chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup> se traduirait par une suractivation de ces FdT pro-inflammatoires.

Pris ensemble, mes recherches et celles récentes de mon équipe, suggèrent, un nouveau rôle qu'HMGB1 dans le noyau du macrophage et dans celui de l'hépatocyte. HMGB1 nucléaire module la lipogénèse hépatique, ainsi que l'inflammation des macrophages (Personnaz et al. 2021).

### Le nutrient sensing et la voie mTOR :



En plus de la caractérisation du phénotype inflammatoire présentée dans l'article 2, le macrophage HMGB1<sup>ΔMac</sup> semblerait, car il s'agit encore de données préliminaires, présenter un défaut de "nutrient sensing" (Figure 46 ci-contre). Cette hypothèse découle de l'analyse du métabolome fait sur des BMDM HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en culture dans différents états : Croissance-prolifération, M0, et M1. Dans la condition de croissance *i.e* de cellules en prolifération (défini par une haute concentration de glucose (4,5 g/L) et 10 % de sérum de veau fetal) nous observons chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup> une diminution de l'ensemble des métabolites intracellulaires.

**Figure 46 :** Heatmap comparant la quantité des métabolites intracellulaires chez les BMDM de souris HMGB1<sup>Flox</sup> et HMGB1<sup>ΔMac</sup> en condition de croissance. Les métabolites des BMDM sont dosés en spectrométrie de masse. Les données sont moyennées et rapportées en fold du HMGB1<sup>Flox</sup>. Les tests statistiques réalisés sont des multi t-test (valeurs sur le côté droit de la heatmap) et un test two-way anova est réalisé sur l'ensemble des métabolites entre le HMGB1<sup>Flox</sup> et le HMGB1<sup>ΔMac</sup> (valeur sur le haut de la heatmap).

Cette diminution quasi systématique des taux des différents métabolites comme le PRPP (Phosphoribosylpyrophosphate) ou le FBP (Fructose 1,6 bis phosphate), ou encore le Cis-aconitate, semble suggérer un défaut dans le "nutrient sensing" et des voies de synthèse cellulaire impliquant mTOR et la voie AKT.

Dans le domaine d'étude du métabolisme cellulaire, la question des flux métaboliques (définie par l'écart entre les taux de production et les taux de consommation des molécules à travers une voie métabolique) est fondamentale. Cela signifie qu'il y a deux explications possibles à cette diminution de la quantité de métabolites. (i) Leur synthèse est diminuée (problème de "nutrient sensing"), (ii) Leur consommation est augmentée (voies cataboliques). Si on se place à un nombre de cellules égal, on peut envisager deux scénarios pour expliquer ces variations d'endo-métabolites :

-l'internalisation des substrats/nutriments est déficiente en lien avec une machinerie de digestion lysosomale altérée, ce qui induit *de facto* une diminution de la quantité de ces métabolites

-pour atteindre une prolifération cellulaire optimale, la cellule HMGB1<sup>ΔMac</sup> consomme davantage de substrats en accentuant ses voies cataboliques.

De plus amples recherches sont nécessaires pour définir qui, entre la synthèse, ou la consommation est altérée chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup>, notamment en mettant en place une approche de fluxomique grâce à l'utilisation de substrats marqués qui nous permettra de suivre leur internalisation et leur consommation. En parallèle, il nous faudra vérifier que les variations des taux de métabolites ne soient pas dues à une diminution du volume cytoplasmique par cellule ou à une diminution du nombre de cellules analysées chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup>. Nous ne pouvons pour le moment pas exclure ces éventualités même si au cours de mes analyses, ces paramètres (taille et nombre) ne m'ont pas paru varier entre les 2 génotypes.

Prises ensemble, ces données suggèrent qu'à l'état naïf, le macrophage HMGB1<sup>ΔMac</sup> présenterait une dysfonction lysosomale qui pourrait altérer la détection des nutriments par mTORC1. La diminution du "tonus" du complexe mTORC1 pourrait être fondamentale sur la fonction de la cellule, son programme transcriptionnel et par voie de conséquence sur l'orientation prise par le macrophage, avec une polarisation préférentielle M1.

## II /Effets délétères : tempête cytokinique vs dysfonctions lysosomales

Notre travail a permis de montrer en utilisant trois modèles inflammatoires, que l'absence du gène *Hmgb1* entraînait la mort prématurée des animaux. Cette mort précoce a en fonction des modèles probablement des causes différentes. Dans deux cas (overdose de paracétamol et injection létale de LPS) la mort des animaux est imputable à la tempête cytokinique en lien avec l'inflammation systémique (et aux possibles altérations de l'efferocytose). Dans un cas (infection par l'agent *Candida albicans*), la mort des animaux semble imputable à l'impossibilité pour les macrophages HMGB1<sup>ΔMac</sup> d'exercer correctement leur activité fongicide, par une dysfonction lysosomale et une production de ROS amoindrie.

En effet, dans les deux premiers modèles inflammatoires, nous avons mis en évidence une production accrue de cytokines inflammatoires chez le HMGB1<sup>ΔMac</sup> par rapport au HMGB1<sup>Flox</sup>. Au cours du temps, notamment seize heures après l'injection, les concentrations plasmatiques des cytokines sont les plus hautes (Figure 5D) et coïncident avec le premier décès chez les souris HMGB1<sup>ΔMac</sup> (Figure 5B). Cela suggère qu'au cours d'inflammation stérile (APAP) ou d'endotoxémie (LPS) il existerait un rôle direct des cytokines sur la survenue de la mortalité. Ceci souligne le côté pro-inflammatoire du HMGB1<sup>ΔMac</sup>.

A l'inverse dans le modèle de candidose péritonéale, à part pour le *Tnfa*, nous ne retrouvons pas d'augmentation des transcrits clefs de l'inflammation entre le HMGB1<sup>Flox</sup> et de HMGB1<sup>ΔMac</sup>, *in vitro* (Figure Supplémentaire 6A). De plus amples expériences sont nécessaires afin de doser les cytokines dans le plasma des animaux infectés par *C. albicans* pour confirmer ou pas cette hypothèse.

D'autres part, nous observons chez le pMAC HMGB1<sup>ΔMac</sup> une tendance à la diminution des capacités de phagocytose ainsi qu'un défaut d'activité fongicide dépendant de la production de ROS (Figure 5K-L). HMGB1 semble dans le cas des pMAC promouvoir la machinerie de protéolyse et la production de ROS *in vitro* par la NADPH-oxydase impliquée dans la réponse antifongique.

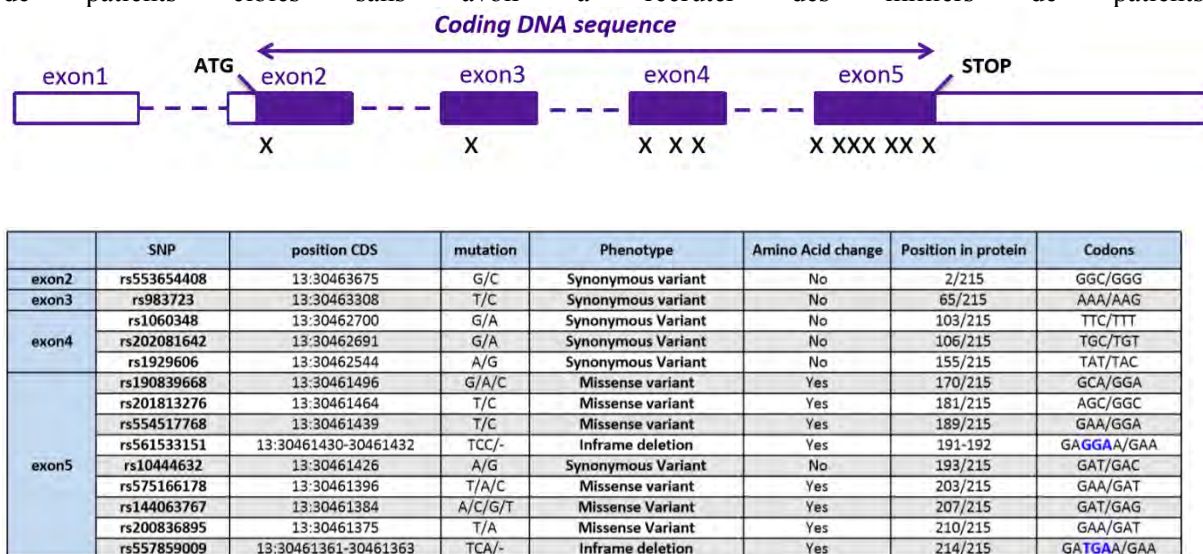
Cette différence sur la production de ROS dans le pMAC le HMGB1<sup>ΔMac</sup> semble s'opposer à celle observée à la Figure 1G-H, où l'on observe une augmentation de la production de ROS dans le HMGB1<sup>ΔMac</sup>-BMDM. Cette différence peut être due à la nature du modèle cellulaire (BMDM vs pMACs) et reste à caractériser en profondeur. Néanmoins, certains éléments de réponses peuvent être avancés. (i) La réponse immunitaire *in vivo*, face au pathogène *C.albicans* est complexe et nécessite une étroite interaction entre deux polarisations opposées, les M1 (induit par réponse Th1) et les M2 (induit par réponse Th2) (Romani, s. d., 199). Chacun de ces deux phénotypes permet aux pMACs une élimination du pathogène par phagocytose et production de ROS. Le succès de l'élimination dépend donc d'une balance M1/M2. En effet, la polarisation M2a (induit par l'IL-13) a été décrite, dans le cas d'une infection par *C.albicans* comme essentielle pour la lutte contre l'infection (Coste et al. 2008). (ii) Dans le modèle cellulaire du BMDM, nous avons clairement mis en évidence une prédisposition à entraîner une réponse inflammatoire de type M1 (Figure Supl 3). On peut supposer que cela limiterait les capacités à entraîner une réponse anti-inflammatoire de type M2. Si on transpose cette analyse faite sur le BMDM, aux pMACs dans le cas d'une infection par *C.albicans* nous aurions un déséquilibre de la balance en faveur des réponses M1 et M2 et certainement une élimination moins efficace. (iii) Cependant la transposition des mécanismes observés chez le BMDM aux pMACs reste délicate. Une récente étude compare ces deux types de macrophages et conclut que leurs caractéristiques fonctionnelles divergent (Zajd et al. 2020). Plus d'analyses sont notamment nécessaires pour comprendre le rôle d'HMGB1 dans les différents mécanismes d'activation de la NADPH oxydase entre le BMDM et le pMAC.

### III- HMGB1 chez l'Homme :

HMGB1 nucléaire joue un rôle anti-inflammatoire par des mécanismes moléculaires encore en cours d'identification. Les résultats *in vivo* confirment l'importance que joue HMGB1 dans la régulation du choc inflammatoire. Son absence dans le paysage chromatinien peut contribuer aux décès des animaux lors des différents chocs inflammatoires stériles ou infectieux.

Basé sur ces résultats très encourageants et prometteurs, nous sommes en train de développer une stratégie translationnelle en clinique de façon à confirmer si HMGB1 pourrait également jouer un rôle important dans l'amplitude de la réponse inflammatoire chez l'Homme. Un grand nombre de travaux dans la littérature décrivent une augmentation des taux plasmatique d'HMGB1 après un choc inflammatoire comme le choc septique, divers empoisonnements (paracétamol, paraquat), ou autres pathologies inflammatoires chroniques comme le purpura, arthrite rhumatoïde ou au cours d'un rejet de greffe (W. Huang, Tang, et Li 2010; D. Wang et al. 2020; Zamora et al. 2019; U. Andersson et Erlandsson-Harris 2004; Y. Huang et al. 2007). A ce jour, cette augmentation sérique est associée à une activation du système immunitaire, et une nécrose tissulaire conduisant à une réponse exagérée.

Nous posons l'hypothèse que chez l'Homme, le gène *Hmgb1* pourrait présenter un certain degré de variabilité, appelé classiquement polymorphisme génique (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP). Nous supposons que certains SNPs du gène *Hmgb1* pourrait bloquer/changer/modifier la fonction nucléaire d'HMGB1, soit par exemple en jouant sur ses capacités à interagir avec l'ADN et/ou sur sa localisation sub-cellulaire. Sur le plan clinique, ça signifierait que les patients présentant certains variants du gène *Hmgb1* auraient des prédispositions à développer des maladies inflammatoires chroniques ou à répondre très défavorablement à des chocs aigus. Actuellement, quatorze variants exoniques ont déjà été décrits (Voir figure 47 ci-dessous), dont certains concernent les deux signaux de localisation nucléaire. Un plus grand nombre de variants concernent l'ensemble du locus *Hmgb1* (autour d'une centaine), ce qui suggère une grande variabilité du gène, que l'on devrait retrouver dans la cohorte de patients ciblés sans avoir à recruter des milliers de patients.



**Figure 47: Les variants du gènes d'*Hmgb1* chez l'Homme.** Schéma de la séquence codante d'ADN d'*Hmgb1* (CDS) et les positions des SNP exoniques identifiées (haut). Tableau des informations moléculaire des 14 SNPs classées par exons extrait depuis la banque de données ensembl! (Bas).

Techniquement les SNPs peuvent être identifiés par PCR, dans la région codante (CDS) mais peuvent aussi être présents dans les régions flanquantes du gène (Promoter et UTR) ou même les introns. Pour ce faire, nous avons développé une collaboration avec le Dr. Bounes-Vardon du service d'anesthésie-réanimation du CHU de Rangueil de Toulouse, où nous aurons accès à du sang total de patients admis en réanimation après différents chocs inflammatoires (principalement choc septique). L'ensemble des patients sera bien caractérisé sur le plan médical et nous pourrons avoir accès aux données biologiques

(taux de lactate, numération de formule sanguine, pression artérielle etc) qui seront autant de paramètres cruciaux qui pourront servir à la stratification des patients. Sur chacun des patients, nous utiliserons l'ADN extrait sur les cellules sanguines, pour réaliser le séquençage du locus *Hmgb1*.

Très brièvement et pour se lancer à la recherche des SNP, sur une cohorte de patients stratifiés sur la sévérité du choc septique, nous développerons une stratégie en deux temps où (i) nous identifions les SNP présents et les classerons en fonction de la sévérité du choc septique. Ensuite, (ii) nous validerons fonctionnellement *in vitro* leurs effets sur des cultures de macrophages. Enfin (iii) ce projet sera l'occasion de mesurer les taux circulants d'HMGB1 et d'évaluer s'il peut être considéré comme un biomarqueur diagnostique et/ou prédictif de la sévérité du choc septique, ce qui a par ailleurs déjà été suggéré pour l'overdose de paracétamol et le choc septique notamment (Gibot et al. 2007; Dear et al. 2018).

Ce projet a reçu la validation du comité de protection des personnes (CPP) et le recrutement devrait commencer rapidement, en fonction de la durée de la crise de la COVID-19 qui accapare fortement l'activité du service. Néanmoins, un recrutement de patients COVID, et l'étude du polymorphisme du gène *Hmgb1*, pourrait avoir beaucoup de sens, notamment sur l'étiologie de la tempête cytokinique. Plusieurs études ont pu montrer une forte corrélation entre la mortalité de la COVID19 et la survenue de tempête cytokinique, et plusieurs publications scientifiques ont déjà établi des liens entre HMGB1 et la sévérité de cette infection virale (Ulf Andersson, Ottestad, et Tracey 2020; L. Chen et al. 2020).

## Matériels et méthodes

**Animaux :** Les animaux sont manipulés selon les accords de la charte éthique de l'INSERM (US006 CREFFRE-CEEA-122, 1710480320).

**Les modèles de survie :** Candidémie : Des mâles de quatre mois sont injectés en i.p avec une solution de PBS contenant  $100 \times 10^8$  *C.Albicans*.

Overdose d'APAP : Une solution aqueuse d'acétaminophène est administrée *per os* à des mâles de 4 mois à une concentration de 300-500 mg/kg.

L'endotoxémie : Des mâles de quatre mois sont injectés en rétro-orbital après anesthésie gazeuse au isoflurane, avec une solution saline de LPS (17,5 mg/kg).

**Culture de BMDM :** Isolation des cellules : Les animaux sont euthanasiés par dislocation cervicale. Les pattes postérieures des animaux sont prélevées. Les fémurs et tibias sont isolés et gardés humides dans du PBS stérile le temps du sacrifice. Une fois dans un champ stérile, avec des instruments stériles, les épiphyses des os sont sectionnées et la moelle osseuse est expulsée de l'os par un lavage DMEM:F12 (Gibco). Plus précisément, des seringues de 5ml sont remplies de milieu et à l'aide d'aiguilles de 24 gauges, la moelle osseuse est chassée par le milieu de lavage de la cavité de la diaphyse osseuse. Les cellules sont filtrées ( $40\mu\text{m}$ ), puis une lyse des érythrocytes est réalisée pendant cinq minutes à  $37^\circ\text{C}$ . Les cellules progénitrices de la moelle osseuse sont alors comptées au compteur de cellule (Coulter) et ensemencées par une densité de 20 000 cellules pour les plaques 24 puits de seahorse (Agilent). Ou à une densité de 100 000 cellules pour les plaques de culture 12 puits, ou à une densité 250 000 cellules pour les plaques de culture 6 puits.

Culture : Les cellules sont cultivées en milieu DMEM/F12 à 10% de SVF et 1% de P/S (pénicilline/streptavidine) avec 20 ng/ml de M-CSF (Peprotech). Elles sont changées tous les trois jours.

Différentiation : A J6 les cellules sont induites en différenciation sur les dernières 24 heures. Cette différenciation se fait avec du DMEM/F12 complet à 5% de SVF et 5% de P/S (pénicilline/streptavidine) avec 20 ng/ml de M-CSF (Peprotech) pour les M0. Ce milieu de différenciation est complété avec 10 ng/ml de LPS et 40 ng/ml d'IFN $\gamma$  (Peprotech) pour les M1 et de 20 ng/ml d'IL-13 pour les M2.

**Exploration de l'OXPPOS et glycolyse (Seahorse) :** OXPPOS (MitoStress) ou Glycolyse : Les BMDM sont ensemencés à J0 à 20 000 cellules par puit de 24 puits dans la plaque de seahorse avec 500  $\mu\text{L}$  de milieu (DMEM : F12) 10% de SVF et 1% de P/S (pénicilline/streptavidine) avec 20 ng/ml de M-CSF (Peprotech). Les cellules sont changées tous les trois jours avec du milieu frais. Le J7 les cellules subissent le mitostress.

OCR : Les BMDM sont alors incubés dans le milieu XF base medium (Seahorse, 102353-100) chauffé à  $37^\circ\text{C}$  et complété avec 10 mM de glucose, 2mM de glutamine et 2 mM de Pyruvate. La plaque de culture et les cellules sont alors placées dans un incubateur à  $37^\circ\text{C}$  sans  $\text{CO}_2$  pendant une heure avant l'expérience. Les drogues sont alors placées dans les puits : l'oligomycine dans le port A, le FCCP dans le port B, la roténone et l'antimycine dans le port C, de la "sensor cartridge" préalablement hydraté durant 24 heures.

ECAR : Les BMDM sont alors incubés dans le milieu XF base medium (Seahorse, 102353-100) chauffé à  $37^\circ\text{C}$  et complété avec 2mM de glutamine. La plaque de culture et les cellules sont alors placées dans

un incubateur à 37°C sans CO<sub>2</sub> pendant une heure avant l'expérience. Les drogues sont alors placées dans les puits : le glucose dans le port A, l'oligomycine dans le port B, le 2DG dans le port C, de la "sensor cartridge" préalablement hydraté durant 24 heures.

Le taux de consommation d'oxygène (OCR) et celui de l'acidification extracellulaire (ECAR) des BMDM est déterminée après une administration séquentielle des drogues avec une concentration finale : 1.0 µM oligomycine (Selleck, S1478), 0.75 µM FCCP (Sigma-Aldrich, C2920) et 100 nM rotenone (Sigma-Aldrich, R8875) + 1.0 µM antimycine (Biovision, 2247-50), 100 mM de glucose (Sigma-Aldrich, G8270), 500 mM 2DG (Sigma-Aldrich, D6134).

**Isolation des macrophages péritonéaux :** Les animaux sont euthanasiés dans une étuve à CO<sub>2</sub>. Les macrophages péritonéaux sont collectés à l'aide de 5mL de PBS injectés puis récupérés dans le péritoine. Une lyse des érythrocytes est réalisée pendant 5 minutes à 37°C.

**Préparation des fractions stromales : Prélèvements des organes :** Les animaux sont anesthésiés avec une dose de pentobarbital (50 mg/kg) une laparotomie est réalisée, puis les animaux sont perfusés avec une solution de PBS-EDTA depuis la veine cave, dans le sens inverse de la circulation sanguine. Ceci afin de chasser le sang des différents organes et ainsi éliminer la fraction immune circulante de l'organe. Une incision de la veine inférieure du foie, permet l'épanchement de la solution de lavage et du sang présent dans les vaisseaux. Les organes (foie, rate, sang) sont récupérés.

Le sang : 60µL de sang est prélevé et conservé sur glace dans un tube avec 40µL d'EDTA. Les érythrocytes sont éliminés et lysés par deux incubations dans une solution de lyse des érythrocytes. Les leucocytes sont conservés au fond du tube, par une étape de centrifugation (800 RPM 10 minutes).

Le foie : les deux lobes qui entourent la vésicule biliaire sont prélevés et ciselés dans un tube eppendorf avec des ciseaux chirurgicaux. La préparation est digérée 35 minutes avec de la collagénase D (2.5mg/ml) dans un bain-marie à 37 °C avec une agitation douce. La préparation est ensuite passée sur un gradient de ficoll pour éliminer les hépatocytes. Enfin une lyse des érythrocytes est réalisée. Les leucocytes sont conservés au fond du tube, par une étape de centrifugation (800 RPM 10 minutes).

La rate : la rate est passée au tamis (70µm) et lavée avec 10 ml de PBS. Une lyse des érythrocytes est réalisée sur le filtra de rate. Les leucocytes sont conservés au fond du tube, par une étape de centrifugation (800 RPM 10 minutes).

**Histologie : Fixation :** Les organes sont fixés 24 heures dans une solution de fixation carnoy (60% Ethanol absolu, 30% Chloroforme, 10% Acide acétique). Puis, ils sont transférés dans de l'éthanol 70% pour être ensuite inclus.

Inclusions et coupes : Les inclusions en paraffine sont réalisées par le plateau histologie de l'I2MC, et les coupes sont réalisées sur un Microtome Microm HM340E avec système Niagara à une épaisseur de 5 µm.

Coloration H&E : Les lames blanches alors immergées pendant 3 minutes dans une solution d'Hématoxyline (Sigma-Aldrich 51275), puis 20 secondes dans une solution diluée 1/3 d'éosine (Sigma-Aldrich HT110116) complétée avec de l'alcool absolu.

Immunohistochimie : Les peroxydases endogènes présentes dans le tissu sont éliminées par un traitement avec une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,3% complétée avec de l'eau osmosée pendant 10 minutes. Les épitopes non spécifiques sont masqués avec une solution de saturation (1%BSA -TBST) pendant 10 minutes. L'anticorps primaire contre CLEC4F est dilué au 1/150 puis déposé sur la lamelle. La liaison de l'anticorps I à lieu sur la nuit à 4°C à l'abri de la lumière. Après lavage pour enlever l'anticorps

primaire, l'anticorps secondaire est déposé sur la lamelle. La liaison de l'anticorps II a lieu pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Après lavage, la réaction de révélation se fait avec le réactif chromogène DAB (Dako) pendant 5 minutes. Après lavage, une contre coloration est réalisée en plongeant la lamelle dans une solution d'héματοxyline pendant 3 minutes (Sigma-Aldrich - 51275). Après déshydratation par des bains de concentration croissante d'alcool, les lamelles sont collées à l'aide d'une colle Eukitt (Sigma) et d'une contre lame.

**Numérisation et quantification :** Les lames sont numérisées grâce au scanner de lame Nanozoomer du fabricant Hamamatsu. L'analyse d'image et la quantification sont réalisées en utilisant le logiciel Photoshop®. Les photos montrées sont représentatives.

**Cytométrie en flux : Préparation des fractions stromales :** La viabilité des cellules des différentes fractions stromales est évaluée par l'utilisation du Live/Dead (ThermoFisher). Les anticorps sont mélangés et ajoutés aux cellules après avoir saturé les récepteurs au complément avec un Fc-bloc. La liaison de l'anticorps a lieu pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. Après lavage les cellules lavées sont transférées dans des tubes de cytométrie en flux. Le cytomètre utilisé est un Fortessa.

**Préparation des cellules :** Les BMDM sont lavés de leur milieu de culture à l'aide de PBS chauffé à 37°C. Puis 450µL de milieu de culture contenant la sonde (ovalbumine 1/60ème de la solution stock de 1 mg/ml ; lysotracker 1/25ème de la solution stock de 1 mM) est ajouté sur le tapis cellulaire pendant différents temps. Une fois la réaction faite, les cellules sont à nouveau lavées de leur milieu de culture à l'aide de PBS chauffé à 37°C. Les cellules sont décollées avec de la trypsine 0.05% pendant 5 minutes à 37°C, puis collectées. La viabilité des BMDM est évaluée par l'utilisation du Live/Dead (PE). Les anticorps sont mélangés et ajoutés aux cellules après avoir saturé les récepteurs au complément avec un Fc-bloc.

**Métabolomique : Analyse de l'endo-métabolome :** Les BMDM sont ensemencés en plaque 6 puits sur une lamelle de verre à une densité de 250 000 cellules pour 2,5 mL de milieu de croissance DMEM/F12 à 10% de SVF et 1% de P/S (pénicilline/streptavidine) avec 20 ng/ml de M-CSF (Peprotech). Après les différentes stimulations, les cellules subissent le "quenching" puis sont décollées dans un solvant de (Acétonitrile : Méthanol : H<sub>2</sub>O à des proportions de 4:4:2) avec une concentration de 125 mM d'acide formique et transférées dans un falcon de 15ml contenant 100µL d'IDMS puis soniqué pendant 20 minutes dans un bain avec de la glace. Le protocole est reproduit selon à publication de Martano et al., 2015 (Martano et al. 2015). Les échantillons sont ensuite envoyés avec de la carbo glace au plateau Metatoul pour analyse (Plateau Métatoul, adresse et interlocuteur).

**Analyse de l'exo-métabolome :** Les BMDM sont ensemencés en boîte de petri à une densité de  $1,4 \times 10^6$  cellules pour 14 mL de milieu de croissance DMEM/F12 à 10% de SVF et 1% de P/S (pénicilline/streptavidine) avec 20 ng/ml de M-CSF (Peprotech). Après les différentes stimulations 250 µL du milieu de culture sont collectées à différents temps, et directement plongés dans l'azote puis conservés à -80°C, jusqu'à l'envoi avec de la carbo glace au plateau Metatoul pour analyse.

**RNA-Seq : Préparation des échantillons :** Les BMDM sont cultivées en milieu DMEM/F12 à 10% de SVF et 1% de P/S (pénicilline/streptavidine) avec 20 ng/ml de M-CSF (Peprotech). Elles sont changées tous les 3 jours. Elles ont été ensemencées à une densité de 4 millions à J0 avec 40 mL de milieu de culture complet s boîte de petri de 15cm de diamètre. Il était demandé au minimum pour l'analyse 5µg d'ARNm totaux. Chaque échantillon doit avoir une concentration minimale de 100 ng/µL avec une pureté sur le ratio 260/280 supérieur à 1.8, ainsi qu'une pureté dans le ratio 260/230 supérieur à 1.8. Le volume total d'ARN était de 25µL. L'extraction d'ARNm a été faite selon la procédure en vigueur dans l'équipe, à une extraction au phénol/chloroforme (décrite ci-dessous : Extraction des ARN sur colonne). La préparation des bibliothèques puis le séquençage des ARN a été réalisé le plateau Get-Santé (Emeline



Lhuillier Plateau GeT-Santé, Tel : 05 61 32 56 49, Site web : [get.genotoul.fr](http://get.genotoul.fr), Joindre l'équipe: [getsante@genotoul.fr](mailto:getsante@genotoul.fr) L'analyse des datas a été réalisé par l'équipe de Delphine Labourdette (Plateau INSA- Delphine Labourdette, IE Bioinformaticienne, Plateforme GeT-Biopuces, Tél. : +33 (0)5 61 55 96 87, [delphine.labourdette@insa-toulouse.fr](mailto:delphine.labourdette@insa-toulouse.fr)).

**Dosage des cytokines par multiplexage, Legendplex :** Les plasmas, conservés à -80°C, ont été dosés par cytométrie en flux (cytomètre BD LSR Fortessa et le logiciel LEGENDplex (Biolegend®)). Les plasmas ont été incubés avec 12 billes portant chacune un anticorps reconnaissant une cytokine : CCL5, IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , CXCL1, IL-4, IL-6, IL10, CCL2, CXCL12, IL1 $\alpha$  et IL-13. Une réaction streptavidine PE-biotine a permis d'étudier la fluorescence émise par ces billes. Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF).

**Dosages biochimiques plasmatiques :** Le sang est prélevé à la veine cage après laparotomie. Le plasma est obtenu après centrifugation du sang pendant 5 minutes ; 4°C ; 8 000 RPM. Les dosages des transaminases (ALT pour ALanine aminoTransférase, et AST pour ASpartate aminoTransférase) ont été effectués en collaboration avec la plateforme Anexplor/Genotoul (<http://anexplor.genotoul.fr/>).

**Expression Génique par RT-qPCR en temps réel :** Extraction des ARN sur colonne : les tissus sont broyés (Precellys™, Bertin Technologies) avec 1mL de Qiazol. Les lysats sont ensuite délipidés par ajout de 200 $\mu$ L de chloroforme et centrifugation (15 min, 4°C, 4000 rpm). La phase aqueuse est transférée dans l'éthanol absolu (350 $\mu$ L). Les échantillons (700 $\mu$ L) sont ensuite transférés sur colonnes. Après les différentes étapes décrites dans le protocole du kit et traitement à la DNase pendant 10 minutes, les ARN en solution aqueuse sont dosés par spectrophotométrie (Xpose™, Trinean®). Reverse transcription et qPCR : (kit « High Capacity cDNA reverse transcription » (Applied Biosystem®)). La RT est réalisée selon les consignes du fabricant à partir de 500 ng d'ARN. Lors de la qPCR, les ADNc sont mis en présence des amorces sens et anti-sens (Eurogentec®) diluées à leur concentration optimale.

**Western blotting :** Préparation des échantillons : Les BMDM sont stimulés ou non avec du LPS dilué à une concentration de 10 ng/ml dans le milieu de culture DMEM:F12 (Gibco). Après lavage au PBS chauffé à 37°C les cellules sont lysées puis collectées dans une solution de Laemmli.

Electrophorèse : Après sonication et choc thermique, les protéines sont déposées sur des gels de polyacrylamide pré-coulés (BioRad). Un courant de 100V est ensuite appliqué.

Transfert et immunomarquage : Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par un système de transfert semi-humide (BioRad). Après une étape de saturation (10% BSA-TBST), l'hybridation avec l'anticorps primaire se fait à 4°C pendant la nuit. La détection se fait par l'analyse de la chimioluminescence captée par le ChemiDoc (BioRad) puis quantifiée à l'aide du logiciel Image Lab. Les images montrées sont représentatives.

**Statistiques :** Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne accompagnée de l'erreur standard à la moyenne. La différence statistique des résultats est déterminée en utilisant un test de Mann-Whitney, ou de multi t-test, d'une two-way ANOVA. Le niveau de significativité choisie est p value <0.05 (\*), p value <0.01 (\*\*) et p value <0.001 (\*\*\*).

Sous-type cellulaires et caractéristiques :

Neutro : CD45+ CD11b+ Gr1+ F4/80-

Mono/Macro : CD45+ CD11b+ Gr1+ F4/80+

Lt: CD45+ Gr1- CD3+ CD19-

Lb: CD45+ Gr1- CD3- CD19+

NK: CD45+ Gr1- CD3- NK+

Sondes et leurs concentrations finales :

MitoTracker Green à 1 $\mu$ M (Invitrogen M7514)

Mito Tracker Red à 1 $\mu$ M (Invitrogen M22425)

MitoSOX, à 5 $\mu$ M (Molecular Probes M36008)

Ovalbumine à 15  $\mu$ g/ml (Thermo Fisher D-12053)

Lysotracker à 40 nM (Thermo Fisher L7526)

Bafilomycine A1 à 100 nM (Sigma B1793-2UG)

FAM Flica au 1X (BioRab ICT097)

TMRM à 20 nM (Invitrogen M20036)

## RÉFÉRENCES

- Abraham, E., P. F. Laterre, J. Garbino, S. Pingleton, T. Butler, T. Dugernier, B. Margolis, et al. 2001. « Lenercept (P55 Tumor Necrosis Factor Receptor Fusion Protein) in Severe Sepsis and Early Septic Shock: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III Trial with 1,342 Patients ». *Critical Care Medicine* 29 (3): 503-10. <https://doi.org/10.1097/00003246-200103000-00006>.
- Abu-Remaileh, Monther, Gregory A. Wyant, Choah Kim, Nouf N. Laqtom, Maria Abbasi, Sze Ham Chan, Elizaveta Freinkman, et David M. Sabatini. 2017. « Lysosomal Metabolomics Reveals V-ATPase- and MTOR-Dependent Regulation of Amino Acid Efflux from Lysosomes ». *Science* 358 (6364): 807-13. <https://doi.org/10.1126/science.aan6298>.
- A-Gonzalez, Noelia, Steven J Bensinger, Cynthia Hong, Susana Beceiro, Noam Zelcer, Jose Deniz, Cristina Ramirez, et al. 2010. « Apoptotic Cells Promote Their Own Clearance and Immune Tolerance through Activation of LXR », 23.
- Aird, William C. 2003. « The Role of the Endothelium in Severe Sepsis and Multiple Organ Dysfunction Syndrome ». *Blood* 101 (10): 3765-77. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1887>.
- Amano, Shinya U., Jessica L. Cohen, Pranitha Vangala, Michaela Tencerova, Sarah M. Nicoloso, Joseph C. Yawe, Yuefei Shen, Michael P. Czech, et Myriam Aouadi. 2014. « Local Proliferation of Macrophages Contributes to Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation ». *Cell Metabolism* 19 (1): 162-71. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.017>.
- Andersson, U., et H. Erlandsson-Harris. 2004. « HMGB1 Is a Potent Trigger of Arthritis ». *Journal of Internal Medicine* 255 (3): 344-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2003.01303.x>.
- Andersson, U., H. Wang, K. Palmblad, A. C. Aveberger, O. Bloom, H. Erlandsson-Harris, A. Janson, et al. 2000. « High Mobility Group 1 Protein (HMG-1) Stimulates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (4): 565-70.
- Andersson, Ulf, William Ottestad, et Kevin J. Tracey. 2020. « Extracellular HMGB1: A Therapeutic Target in Severe Pulmonary Inflammation Including COVID-19? ». *Molecular Medicine* 26 (1): 42. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00172-4>.
- Andersson, Ulf, et Kevin J. Tracey. 2011. « HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection ». *Annual Review of Immunology* 29: 139-62. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101323>.
- Arts, Rob J.W., Boris Novakovic, Rob ter Horst, Agostinho Carvalho, Siroon Bekkering, Ekta Lachmandas, Fernando Rodrigues, et al. 2016. « Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity ». *Cell Metabolism* 24 (6): 807-19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.008>.
- Austermeier, Sophie, Lydia Kasper, Johannes Westman, et Mark S Gresnigt. 2020. « I Want to Break Free – Macrophage Strategies to Recognize and Kill Candida Albicans, and Fungal Counter-Strategies to Escape ». *Current Opinion in Microbiology* 58 (décembre): 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.05.007>.
- Ballabio, Andrea, et Juan S. Bonifacino. 2019. « Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0185-4>.
- . 2020. « Lysosomes as Dynamic Regulators of Cell and Organismal Homeostasis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (2): 101-18. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0185-4>.
- Banerjee, Sami, Andressa de Freitas, Arnaud Friggeri, Jaroslaw W. Zmijewski, Gang Liu, et Edward Abraham. 2011. « Intracellular HMGB1 Negatively Regulates Efferocytosis ». *The Journal of Immunology* 187 (9): 4686-94. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101500>.
- Banerjee, Sami, Arnaud Friggeri, Gang Liu, et Edward Abraham. 2010. « The C-Terminal Acidic Tail Is Responsible for the Inhibitory Effects of HMGB1 on Efferocytosis ». *Journal of Leukocyte Biology* 88 (5): 973-79. <https://doi.org/10.1189/jlb.0510262>.

- Baseler, Walter A. 2016. « Autocrine IL-10 Functions as a Rheostat for M1 Macrophage Glycolytic Commitment by Tuning Nitric Oxide Production ». *Redox Biology*, 12.
- Bataller, Ramón, et David A. Brenner. 2005. « Liver Fibrosis ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (2): 209-18. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>.
- Batista-Gonzalez, Ana, Roberto Vidal, Alfredo Criollo, et Leandro J. Carreño. 2020. « New Insights on the Role of Lipid Metabolism in the Metabolic Reprogramming of Macrophages ». *Frontiers in Immunology* 10 (janvier): 2993. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02993>.
- Baumgartner, Roland, Maria J. Forteza, et Daniel F. J. Ketelhuth. 2019. « The Interplay between Cytokines and the Kynurenine Pathway in Inflammation and Atherosclerosis ». *Cytokine*, Special issue: Cytokines in cardiovascular disease, 122 (octobre): 154148. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.09.004>.
- Bennett, I. L., M. Finland, M. Hamburger, E. H. Kass, M. Lepper, et B. A. Waisbren. 1962. « A Double-Blind Study of the Effectiveness of Cortisol in the Management of Severe Infections ». *Transactions of the Association of American Physicians* 75: 198-207.
- Bertheloot, Damien, et Eicke Latz. 2017. « HMGB1, IL-1 $\alpha$ , IL-33 and S100 Proteins: Dual-Function Alarmins ». *Cellular & Molecular Immunology* 14 (1): 43-64. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.34>.
- Bhattacharyya, Sandip, Diane E. Brown, Judson A. Brewer, Sherri K. Vogt, et Louis J. Muglia. 2007. « Macrophage Glucocorticoid Receptors Regulate Toll-like Receptor 4-Mediated Inflammatory Responses by Selective Inhibition of P38 MAP Kinase ». *Blood* 109 (10): 4313-19. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-048215>.
- Blott, Emma J., et Gillian M. Griffiths. 2002. « Secretory Lysosomes ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (2): 122-31. <https://doi.org/10.1038/nrm732>.
- Boess, Franziska, Martin Bopst, Roland Althaus, Stacey Polsky, Steven D. Cohen, Hans-Pietro Eugster, et Urs A. Boelsterli. 1998. « Acetaminophen Hepatotoxicity in Tumor Necrosis Factor/Lymphotoxin-? Gene Knockout Mice ». *Hepatology* 27 (4): 1021-29. <https://doi.org/10.1002/hep.510270418>.
- Bogdan, Christian. 2015. « Nitric Oxide Synthase in Innate and Adaptive Immunity: An Update ». *Trends in Immunology* 36 (3): 161-78. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>.
- Bonaldi, T. 2003. « Monocytic Cells Hyperacetylate Chromatin Protein HMGB1 to Redirect It towards Secretion ». *The EMBO Journal* 22 (20): 5551-60. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg516>.
- Bossche, Jan Van den, Wouter H. Lamers, Eleonore S. Koehler, Jan M. C. Geuns, Leena Alhonen, Anne Uimari, Sini Pirnes-Karhu, et al. 2012. « Pivotal Advance: Arginase-1-Independent Polyamine Production Stimulates the Expression of IL-4-Induced Alternatively Activated Macrophage Markers While Inhibiting LPS-Induced Expression of Inflammatory Genes ». *Journal of Leukocyte Biology* 91 (5): 685-99. <https://doi.org/10.1189/jlb.0911453>.
- Bosurgi, Lidia, Y. Grace Cao, Mar Cabeza-Cabrerizo, Andrea Tucci, Lindsey D. Hughes, Yong Kong, Jason S. Weinstein, et al. 2017. « Macrophage Function in Tissue Repair and Remodeling Requires IL-4 or IL-13 with Apoptotic Cells ». *Science* 356 (6342): 1072-76. <https://doi.org/10.1126/science.aai8132>.
- Bourdi, M. 2002. « Protection against Acetaminophen-Induced Liver Injury and Lethality by Interleukin 10: Role of Inducible Nitric Oxide Synthase ». *Hepatology* 35 (2): 289-98. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.30956>.
- Brinkmann, V. 2004. « Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria ». *Science* 303 (5663): 1532-35. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
- Broz, Petr. 2015. « Caspase Target Drives Pyroptosis ». *Nature* 526 (7575): 642-43. <https://doi.org/10.1038/nature15632>.
- Bustin, Michael, et Natasha K. Neihart. 1979. « Antibodies against Chromosomal HMG Proteins Stain the Cytoplasm of Mammalian Cells ». *Cell* 16 (1): 181-89. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90199-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90199-5).
- Byles, Vanessa, Anthony J. Covarrubias, Issam Ben-Sahra, Dudley W. Lamming, David M. Sabatini, Brendan D. Manning, et Tiffany Horng. 2013. « The TSC-MTOR Pathway Regulates Macrophage Polarization ». *Nature Communications* 4 (1): 2834. <https://doi.org/10.1038/ncomms3834>.
- Cai, Bishuang, Paola Dongiovanni, Kathleen E. Corey, Xiaobo Wang, Igor O. Shmarakov, Ze Zheng, Canan Kasikara, et al. 2020. « Macrophage MerTK Promotes Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Cell Metabolism* 31 (2): 406-421.e7.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.11.013>

- Calogero, S., F. Grassi, A. Aguzzi, T. Voigtländer, P. Ferrier, S. Ferrari, et M. E. Bianchi. 1999. « The Lack of Chromosomal Protein Hmg1 Does Not Disrupt Cell Growth but Causes Lethal Hypoglycaemia in Newborn Mice ». *Nature Genetics* 22 (3): 276-80. <https://doi.org/10.1038/10338>.
- Canton, Johnathan, Rojyar Khezri, Michael Glogauer, et Sergio Grinstein. 2014. « Contrasting Phagosome PH Regulation and Maturation in Human M1 and M2 Macrophages ». Édité par Jean E. Gruenberg. *Molecular Biology of the Cell* 25 (21): 3330-41. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-05-0967>.
- Cao, Chao, Muming Yu, et Yanfen Chai. 2019. « Pathological Alteration and Therapeutic Implications of Sepsis-Induced Immune Cell Apoptosis ». *Cell Death & Disease* 10 (10): 782. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2015-1>.
- Castro-Portuguez, Raul, et George L. Sutphin. 2020. « Kynurenine Pathway, NAD<sup>+</sup> Synthesis, and Mitochondrial Function: Targeting Tryptophan Metabolism to Promote Longevity and Healthspan ». *Experimental Gerontology* 132 (avril): 110841. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110841>.
- Celona, Barbara, Assaf Weiner, Francesca Di Felice, Francesco M. Mancuso, Elisa Cesarini, Riccardo L. Rossi, Lorna Gregory, et al. 2011. « Substantial Histone Reduction Modulates Genomewide Nucleosomal Occupancy and Global Transcriptional Output ». Édité par Peter B. Becker. *PLoS Biology* 9 (6): e1001086. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001086>.
- Chandel, Navdeep S., David S. McClintock, Carlos E. Feliciano, Teresa M. Wood, J. Andres Melendez, Ana M. Rodriguez, et Paul T. Schumacker. 2000. « Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  during Hypoxia ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (33): 25130-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200>.
- Chawla, Ajay. 2010. « Control of Macrophage Activation and Function by PPARs ». *Circulation Research* 106 (10): 1559-69. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.216523>.
- Chawla, Ajay, Yaacov Barak, Laszlo Nagy, Debbie Liao, Peter Tontonoz, et Ronald M. Evans. 2001. « PPAR- $\gamma$  Dependent and Independent Effects on Macrophage-Gene Expression in Lipid Metabolism and Inflammation ». *Nature Medicine* 7 (1): 48-52. <https://doi.org/10.1038/83336>.
- Chen, Liting, Xiaolu Long, Qian Xu, Jiaqi Tan, Gaoxiang Wang, Yang Cao, Jia Wei, et al. 2020. « Elevated Serum Levels of S100A8/A9 and HMGB1 at Hospital Admission Are Correlated with Inferior Clinical Outcomes in COVID-19 Patients ». *Cellular & Molecular Immunology* 17 (9): 992-94. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0492-x>.
- Chen, Qi, Lijun Sun, et Zhijian J. Chen. 2016. « Regulation and Function of the CGAS–STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing ». *Nature Immunology* 17 (10): 1142-49. <https://doi.org/10.1038/ni.3558>.
- Chen, Qun, Edwin J. Vazquez, Shadi Moghaddas, Charles L. Hoppel, et Edward J. Lesnefsky. 2003. « Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: CENTRAL ROLE OF COMPLEX III ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 36027-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304854200>.
- Chiu, H. 2003. « Role of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (P55) in Hepatocyte Proliferation during Acetaminophen-Induced Toxicity in Mice ». *Toxicology and Applied Pharmacology*, octobre. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00369-7](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00369-7).
- Chousterman, Benjamin G., et Marine Arnaud. 2018. « Is There a Role for Hematopoietic Growth Factors During Sepsis? » *Frontiers in Immunology* 9: 1015. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01015>.
- Chousterman, Benjamin G., Filip K. Swirski, et Georg F. Weber. 2017. « Cytokine Storm and Sepsis Disease Pathogenesis ». *Seminars in Immunopathology* 39 (5): 517-28. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>.
- Coats, Brittney R., Kelly Q. Schoenfelt, Valéria C. Barbosa-Lorenzi, Eduard Peris, Chang Cui, Alexandria Hoffman, Guolin Zhou, et al. 2017. « Metabolically activated adipose tissue macrophages perform detrimental and beneficial functions during diet-induced obesity ». *Cell reports* 20 (13): 3149-61. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.096>.
- Condon, Kendall J., et David M. Sabatini. 2019. « Nutrient Regulation of MTORC1 at a Glance ». *Journal of Cell Science* 132 (21): jcs222570. <https://doi.org/10.1242/jcs.222570>.
- Copeland, Shannon, H. Shaw Warren, Stephen F. Lowry, Steve E. Calvano, Daniel Remick,

- et the Inflammation and the Host Response to Injury Investigators. 2005. « Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12 (1): 60-67. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.60-67.2005>.
- Cordero-Espinoza, Lucía, et Meritxell Huch. 2018. « The Balancing Act of the Liver: Tissue Regeneration versus Fibrosis ». *Journal of Clinical Investigation* 128 (1): 85-96. <https://doi.org/10.1172/JCI93562>.
- Coste, Agnès, Céline Lagane, Cédric Filipe, Hélène Authier, Amandine Galès, José Bernad, Victorine Douin-Echinard, et al. 2008. « IL-13 Attenuates Gastrointestinal Candidiasis in Normal and Immunodeficient RAG-2<sup>-/-</sup> Mice via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activation ». *The Journal of Immunology* 180 (7): 4939-47. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4939>.
- Covarrubias, Anthony J, Halil Ibrahim Aksoylar, Jiujiu Yu, Nathaniel W Snyder, Andrew J Worth, Shankar S Iyer, Jiawei Wang, et al. 2016. « Akt-MTORC1 Signaling Regulates Acly to Integrate Metabolic Input to Control of Macrophage Activation ». *ELife* 5 (février): e11612. <https://doi.org/10.7554/eLife.11612>.
- Cover, C, J Liu, A Farhood, E Malle, M Waalkes, M Bajt, et H Jaeschke. 2006. « Pathophysiological Role of the Acute Inflammatory Response during Acetaminophen Hepatotoxicity ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 216 (1): 98-107. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.04.010>.
- Crippa, M P, J M Nickol, et M Bustin. 1991. « Developmental Changes in the Expression of High Mobility Group Chromosomal Proteins. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (5): 2712-14. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49903-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49903-6).
- Crum, Nancy F., Edith R. Lederman, et Mark R. Wallace. 2005. « Infections Associated with Tumor Necrosis Factor-Alpha Antagonists ». *Medicine* 84 (5): 291-302. <https://doi.org/10.1097/01.md.0000180044.19285.9a>.
- Czarnecka, Anna M, Jerzy S Czarnecki, Wojciech Kukwa, Francesco Cappello, Anna Ścińska, et Andrzej Kukwa. 2010. « Molecular Oncology Focus - Is Carcinogenesis a "Mitochondriopathy"? » *Journal of Biomedical Science* 17 (1): 31. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-31>.
- Davies, Luke C., Christopher M. Rice, Erika M. Palmieri, Philip R. Taylor, Douglas B. Kuhns, et Daniel W. McVicar. 2017. « Peritoneal tissue-resident macrophages are metabolically poised to engage microbes using tissue-niche fuels ». *Nature Communications* 8 (décembre). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02092-0>.
- Dear, James W., Joanna I. Clarke, Ben Francis, Lowri Allen, Jonathan Wraight, Jasmine Shen, Paul I. Dargan, et al. 2018. « Risk Stratification after Paracetamol Overdose Using Mechanistic Biomarkers: Results from Two Prospective Cohort Studies ». *The Lancet. Gastroenterology & Hepatology* 3 (2): 104-13. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(17\)30266-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(17)30266-2).
- Demaret, Julie, Fabienne Venet, Arnaud Friggeri, Marie-Angélique Cazalis, Jonathan Plassais, Laurent Jallades, Christophe Malcus, et al. 2015. « Marked Alterations of Neutrophil Functions during Sepsis-Induced Immunosuppression ». *Journal of Leukocyte Biology* 98 (6): 1081-90. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0415-168RR>.
- Deng, Wenjun, Shan Zhu, Ling Zeng, Jiao Liu, Rui Kang, Minghua Yang, Lizhi Cao, et al. 2018. « The Circadian Clock Controls Immune Checkpoint Pathway in Sepsis ». *Cell Reports* 24 (2): 366-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.026>.
- Di, Anke, Shiqin Xiong, Zhiming Ye, R. K. Subbarao Malireddi, Satoshi Kometani, Ming Zhong, Manish Mittal, et al. 2018. « The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation ». *Immunity* 49 (1): 56-65.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.032>.
- Diana, Francesca, Riccardo Sgarra, Guidalberto Manfioletti, Alessandra Rustighi, Dalisa Poletto, Maria Teresa Sciortino, Antonio Mastino, et Vincenzo Giancotti. 2001. « A Link between Apoptosis and Degree of Phosphorylation of High Mobility Group A1a Protein in Leukemic Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (14): 11354-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009521200>.
- Diebold, Lauren, et Navdeep S. Chandel. 2016. « Mitochondrial ROS Regulation of Proliferating Cells ». *Free Radical Biology and Medicine* 100 (novembre): 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.198>.

- Ditsworth, Dara, Wei-Xing Zong, et Craig B. Thompson. 2007. « Activation of Poly(ADP)-Ribose Polymerase (PARP-1) Induces Release of the Pro-Inflammatory Mediator HMGB1 from the Nucleus ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (24): 17845-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701465200>.
- Divakaruni, Ajit S., Wei Yuan Hsieh, Lucía Minarrieta, Tin N. Duong, Kristen K.O. Kim, Brandon R. Desousa, Alexander Y. Andreyev, et al. 2018. « Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis ». *Cell Metabolism* 28 (3): 490-503.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.001>.
- Dixon, Laura J., Mark Barnes, Hui Tang, Michele T. Pritchard, et Laura E. Nagy. 2013. « Kupffer Cells in the Liver ». In *Comprehensive Physiology*, édité par Ronald Terjung, c120026. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120026>.
- Doran, Amanda C., Arif Yurdagul, et Ira Tabas. 2020. « Efferocytosis in Health and Disease ». *Nature Reviews Immunology* 20 (4): 254-67. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0240-6>.
- Dragotakes, Quigly, Kaitlin M. Stouffer, Man Shun Fu, Yehonatan Sella, Christine Youn, Olivia Insun Yoon, Carlos M. De Leon-Rodriguez, Joudeh B. Freij, Aviv Bergman, et Arturo Casadevall. 2020. « Macrophages Use a Bet-Hedging Strategy for Antimicrobial Activity in Phagolysosomal Acidification ». *Journal of Clinical Investigation*, juin, 10.1172/JCI133938. <https://doi.org/10.1172/JCI133938>.
- Duggan, Seána, Ines Leonhardt, Kerstin Hünninger, et Oliver Kurzai. 2015. « Host Response to *Candida Albicans* Bloodstream Infection and Sepsis ». *Virulence*, mars, 1-11. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.988096>.
- Dumont, Adélie, ManKS. Lee, Thibault Barouillet, Andrew Murphy, et Laurent Yvan-Charvet. 2020. « Mitochondria Orchestrate Macrophage Effector Functions in Atherosclerosis ». *Molecular Aspects of Medicine*, novembre, 100922. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100922>.
- Düvel, Katrin, Jessica L. Yecies, Suchithra Menon, Pichai Raman, Alex I. Lipovsky, Amanda L. Souza, Ellen Triantafellow, et al. 2010. « Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of MTOR Complex 1 ». *Molecular Cell* 39 (2): 171-83. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>.
- Ehrchen, Jan, Lars Steinmüller, Katarzyna Barczyk, Klaus Tenbrock, Wolfgang Nacken, Martin Eisenacher, Ursula Nordhues, Clemens Sorg, Cord Sunderkötter, et Johannes Roth. 2007. « Glucocorticoids Induce Differentiation of a Specifically Activated, Anti-Inflammatory Subtype of Human Monocytes ». *Blood* 109 (3): 1265-74. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-001115>.
- El Gazzar, Mohamed, Barbara K. Yoza, Xiaoping Chen, Benjamin A. Garcia, Nicolas L. Young, et Charles E. McCall. 2009. « Chromatin-Specific Remodeling by HMGB1 and Linker Histone H1 Silences Proinflammatory Genes during Endotoxin Tolerance ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (7): 1959-71. <https://doi.org/10.1128/MCB.01862-08>.
- Eric Yoon. 2016. « Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: A Comprehensive Update ». *Journal of Clinical and Translational Hepatology* 4 (2). <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00052>.
- Evankovich, John, Sung W. Cho, Ruilin Zhang, Jon Cardinal, Rajeev Dhupar, Lemeng Zhang, John R. Klune, Jason Zlotnicki, Timothy Billiar, et Allan Tsung. 2010. « High Mobility Group Box 1 Release from Hepatocytes during Ischemia and Reperfusion Injury Is Mediated by Decreased Histone Deacetylase Activity ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (51): 39888-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.128348>.
- Fang, Liang, Johnie Hodge, Fatma Saaoud, Junfeng Wang, Stephen Iwanowycz, Yuzhen Wang, Yvonne Hui, Trent D. Evans, Babak Razani, et Daping Fan. 2017. « Transcriptional Factor EB Regulates Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment ». *OncImmunology* 6 (5): e1312042. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1312042>.
- Ferrari, S, L Ronfani, S Calogero, et M.E. Bianchi. 1994. « The Mouse Gene Coding for High Mobility Group 1 Protein (HMG1) ». *Journal of Biological Chemistry* 269 (46): 28803-8. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61977-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61977-0).
- Fiorentino, David F, Albert Zlotnik, Timothy R Mosmann, Maureen Howard, et Anne O'Garra. s. d. « Pillars Article: IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated

- Macrophages. *J. Immunol.* 1991. 147: 3815–3822 », 9.
- Fitzgibbons, Timothy P., et Michael P. Czech. 2016. « Emerging Evidence for Beneficial Macrophage Functions in Atherosclerosis and Obesity-Induced Insulin Resistance ». *Journal of Molecular Medicine* 94 (3): 267-75. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1385-4>.
- Fleischmann, Carolin, André Scherag, Neill K. J. Adhikari, Christiane S. Hartog, Thomas Tsaganos, Peter Schlattmann, Derek C. Angus, Konrad Reinhart, et International Forum of Acute Care Trialists. 2016. « Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-Treated Sepsis. Current Estimates and Limitations ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (3): 259-72. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>.
- Florescu, Diana F., et Andre C. Kalil. 2014. « The Complex Link between Influenza and Severe Sepsis ». *Virulence* 5 (1): 137-42. <https://doi.org/10.4161/viru.27103>.
- Frey, Terrence G., et Carmen A Mannella. 2000. « The Internal Structure of Mitochondria ». *Trends in Biochemical Sciences* 25 (7): 319-24. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01609-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01609-1).
- Friggeri, Arnaud, Yanping Yang, Sami Banerjee, Yong-Jun Park, Gang Liu, et Edward Abraham. 2010. « HMGB1 Inhibits Macrophage Activity in Efferocytosis through Binding to the  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 299 (6): C1267-76. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00152.2010>.
- Fukuda, Tokiko, Ashley Roberts, Meghan Ahearn, Kristien Zaal, Evelyn Ralston, Paul H. Plotz, et Nina Raben. 2006. « Autophagy and Lysosomes in Pompe Disease ». *Autophagy* 2 (4): 318-20. <https://doi.org/10.4161/auto.2984>.
- Funk, Colin D. 2001. « Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology » 294: 6.
- Furman, David, Judith Campisi, Eric Verdin, Pedro Carrera-Bastos, Sasha Targ, Claudio Franceschi, Luigi Ferrucci, et al. 2019. « Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span ». *Nature medicine* 25 (12): 1822-32. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>.
- Furusawa, Takashi, Jae-Hwan Lim, Frédéric Catez, Yehudit Birger, Susan Mackem, et Michael Bustin. 2006. « Down-Regulation of Nucleosomal Binding Protein HMGN1 Expression during Embryogenesis Modulates Sox9 Expression in Chondrocytes ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (2): 592-604. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.2.592-604.2006>.
- Gaber, Timo, Cindy Strehl, et Frank Buttgerit. 2017. « Metabolic Regulation of Inflammation ». *Nature Reviews Rheumatology* 13 (5): 267-79. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.37>.
- Gao, Xiao-pei, Theodore J. Standiford, Arshad Rahman, Michael Newstead, Steven M. Holland, Mary C. Dinauer, Qing-hui Liu, et Asrar B. Malik. 2002. « Role of NADPH Oxidase in the Mechanism of Lung Neutrophil Sequestration and Microvessel Injury Induced by Gram-Negative Sepsis: Studies in P47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> and Gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> Mice ». *The Journal of Immunology* 168 (8): 3974-82. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3974>.
- Gardella, Stefania, Cristina Andrei, Denise Ferrera, Lavinia V Lotti, Maria R Torrisi, Marco E Bianchi, et Anna Rubartelli. 2002. « The Nuclear Protein HMGB1 Is Secreted by Monocytes via a Non-classical, Vesicle-mediated Secretory Pathway ». *EMBO Reports* 3 (10): 995-1001. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf198>.
- Gariboldi, M, L De Gregorio, S Ferrari, G Manenti, M A Pierotti, M E Bianchi, et T A Dragani. s. d. « Mapping of the Hmgl Gene and of Seven Related Sequences in the Mouse », 5.
- GBD 2015 Obesity Collaborators, Ashkan Afshin, Mohammad H. Forouzanfar, Marissa B. Reitsma, Patrick Sur, Kara Estep, Alex Lee, et al. 2017. « Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years ». *The New England Journal of Medicine* 377 (1): 13-27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614362>.
- Gdynia, G., M. Keith, J. Kopitz, M. Bergmann, A. Fassl, A. N. R. Weber, J. George, et al. 2010. « Danger Signaling Protein HMGB1 Induces a Distinct Form of Cell Death Accompanied by Formation of Giant Mitochondria ». *Cancer Research* 70 (21): 8558-68. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0204>.
- Gdynia, Georg, Sven W. Sauer, Jürgen Kopitz, Dominik Fuchs, Katarina Duglova, Thorsten Ruppert, Matthias Miller, et al. 2016. « The HMGB1 Protein Induces a Metabolic Type of Tumour Cell Death by Blocking Aerobic Respiration ». *Nature*



- Communications* 7 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncomms10764>.
- Geng, Jing, Xiufeng Sun, Ping Wang, Shihao Zhang, Xiaozhen Wang, Hongtan Wu, Lixin Hong, et al. 2015. « Kinases Mst1 and Mst2 Positively Regulate Phagocytic Induction of Reactive Oxygen Species and Bactericidal Activity ». *Nature Immunology* 16 (11): 1142-52. <https://doi.org/10.1038/ni.3268>.
- Gibot, Sébastien, Frédéric Massin, Aurélie Cravoisy, Damien Barraud, Lionel Nace, Brune Levy, et Pierre-Edouard Bollaert. 2007. « High-Mobility Group Box 1 Protein Plasma Concentrations during Septic Shock ». *Intensive Care Medicine* 33 (8): 1347-53. <https://doi.org/10.1007/s00134-007-0691-2>.
- Giles, Daniel A., Maria E. Moreno-Fernandez, Traci E. Stankiewicz, Simon Graspeuntner, Monica Cappelletti, David Wu, Rajib Mukherjee, et al. 2017. « Thermoneutral Housing Exacerbates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice and Allows for Sex-Independent Disease Modeling ». *Nature Medicine* 23 (7): 829-38. <https://doi.org/10.1038/nm.4346>.
- Ginhoux, Florent, Joachim L. Schultze, Peter J. Murray, Jordi Ochando, et Subhra K. Biswas. 2016. « New Insights into the Multidimensional Concept of Macrophage Ontogeny, Activation and Function ». *Nature Immunology* 17 (1): 34-40. <https://doi.org/10.1038/ni.3324>.
- Glozak, Michele A., Nilanjan Sengupta, Xiaohong Zhang, et Edward Seto. 2005. « Acetylation and Deacetylation of Non-Histone Proteins ». *Gene* 363 (décembre): 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.010>.
- Godwin, James W, Alexander R Pinto, et Nadia A Rosenthal. s. d. « Macrophages Are Required for Adult Salamander Limb Regeneration », 6.
- Golen, Rowan F. van, Megan J. Reiniers, Gerben Marsman, Lindy K. Alles, Derrick M. van Rooyen, Björn Petri, Vincent A. Van der Mark, et al. 2019. « The Damage-Associated Molecular Pattern HMGB1 Is Released Early after Clinical Hepatic Ischemia/Reperfusion ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865 (6): 1192-1200. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.014>.
- Goncalves, Renata L. S., Michael Schlame, Alexander Bartelt, Martin D. Brand, et Gökhan S. Hotamışlıgil. s. d. « Cardiolipin Deficiency in Barth Syndrome Is Not Associated with Increased Superoxide/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in Heart and Skeletal Muscle Mitochondria ». *FEBS Letters* n/a (n/a). Consulté le 30 décembre 2020. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13973>.
- Goodwin, Graham H., Clive Sanders, et Ernest W. Johns. 1973. « A New Group of Chromatin-Associated Proteins with a High Content of Acidic and Basic Amino Acids ». *European Journal of Biochemistry* 38 (1): 14-19. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03026.x>.
- Gordon, Siamon. 2008. « Elie Metchnikoff: Father of Natural Immunity ». *European Journal of Immunology* 38 (12): 3257-64. <https://doi.org/10.1002/eji.200838855>.
- . 2016. « Phagocytosis: An Immunobiologic Process ». *Immunity* 44 (3): 463-75. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>.
- Gow, Deborah J., David P. Sester, et David A. Hume. 2010. « CSF-1, IGF-1, and the Control of Postnatal Growth and Development ». *Journal of Leukocyte Biology* 88 (3): 475-81. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310158>.
- Gray, Matthew A. 2016. « Phagocytosis Enhances Lysosomal and Bactericidal Properties by Activating the Transcription Factor TFEB », 11.
- Gray, Michael W. 2017. « Lynn Margulis and the Endosymbiont Hypothesis: 50 Years Later ». Édité par Keith G. Kozminski. *Molecular Biology of the Cell* 28 (10): 1285-87. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-07-0509>.
- Greaves, Laura C., Amy K. Reeve, Robert W. Taylor, et Doug M. Turnbull. 2012. « Mitochondrial DNA and Disease ». *The Journal of Pathology* 226 (2): 274-86. <https://doi.org/10.1002/path.3028>.
- Griffiths, Elinor J., et Guy A. Rutter. 2009. « Mitochondrial Calcium as a Key Regulator of Mitochondrial ATP Production in Mammalian Cells ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787 (11): 1324-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.019>.
- Grivennikova, V. G., et A. D. Vinogradov. 2013. « Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species ». *Biochemistry (Moscow)* 78 (13): 1490-1511. <https://doi.org/10.1134/S0006297913130087>.
- Guilbaud, Emma, Emmanuel L Gautier, et Laurent Yvan-Charvet. 2019. « Macrophage Origin, Metabolic Reprogramming and IL-1 $\beta$  Signaling: Promises and Pitfalls in Lung Cancer », 29.

- Guillot, Adrien, et Frank Tacke. 2019. « Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights ». *Hepatology Communications* 3 (6): 730-43. <https://doi.org/10.1002/hep4.1356>.
- Gunasekaran, Manoj Kumar, Wildriss Viranaicken, Anne-Claire Girard, Franck Festy, Maya Cesari, Regis Roche, et Laurence Hoareau. 2013. « Inflammation Triggers High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Secretion in Adipose Tissue, a Potential Link to Obesity ». *Cytokine* 64 (1): 103-11. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.07.017>.
- Guo, Haitao, Justin B. Callaway, et Jenny P.-Y. Ting. 2015. « Inflammation: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics ». *Nature Medicine* 21 (7): 677-87. <https://doi.org/10.1038/nm.3893>.
- Haka, Abigail S., Valéria C. Barbosa-Lorenzi, Hyuek Jong Lee, Domenick J. Falcone, Clifford A. Hudis, Andrew J. Dannenberg, et Frederick R. Maxfield. 2016. « Exocytosis of Macrophage Lysosomes Leads to Digestion of Apoptotic Adipocytes and Foam Cell Formation ». *Journal of Lipid Research* 57 (6): 980-92. <https://doi.org/10.1194/jlr.M064089>.
- Hallowell, R. W., S. L. Collins, J. M. Craig, Y. Zhang, M. Oh, P. B. Illei, Y. Chan-Li, et al. 2017. « mTORC2 Signaling Regulates M2 Macrophage Differentiation in Response to Helminth Infection and Adaptive Thermogenesis ». *Nature Communications* 8 (1): 14208. <https://doi.org/10.1038/ncomms14208>.
- Haloul, Mohamed, Edson R. A. Oliveira, Muhamuda Kader, Jakob Z. Wells, Tyler R. Tominello, Abdeljabar El Andaloussi, Cecelia C. Yates, et Nahed Ismail. 2019. « mTORC1-Mediated Polarization of M1 Macrophages and Their Accumulation in the Liver Correlate with Immunopathology in Fatal Ehrlichiosis ». *Scientific Reports* 9 (1): 14050. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50320-y>.
- Hanahan, Douglas, et Robert A. Weinberg. 2011. « Hallmarks of Cancer: The Next Generation ». *Cell* 144 (5): 646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hara, Hideaki, Paul L Huang, Nariman Panahian, Mark C Fishman, et Michael A Moskowitz. s. d. « Reduced Brain Edema and Infarction Volume in Mice Lacking the Neuronal Isoform of Nitric Oxide Synthase After Transient MeA Occlusion », 7.
- Harber, Karl J., Kyra E. de Goede, Sanne G. S. Verberk, Elisa Meinster, Helga E. de Vries, Michel van Weeghel, Menno P. J. de Winther, et Jan Van den Bossche. 2020. « Succinate Is an Inflammation-Induced Immunoregulatory Metabolite in Macrophages ». *Metabolites* 10 (9): 372. <https://doi.org/10.3390/metabo10090372>.
- Hayama, Yoshitomo, Tetsuya Kimura, Yoshito Takeda, Shigeyuki Nada, Shohei Koyama, Hyota Takamatsu, Sujin Kang, et al. 2018. « Lysosomal Protein Lamtor1 Controls Innate Immune Responses via Nuclear Translocation of Transcription Factor EB ». *The Journal of Immunology* 200 (11): 3790-3800. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701283>.
- Hemmi, Hiroaki, Osamu Takeuchi, Taro Kawai, Tsuneyasu Kaisho, Shintaro Sato, Hideki Sanjo, Makoto Matsumoto, et al. 2000. « A Toll-like Receptor Recognizes Bacterial DNA ». *Nature* 408 (6813): 740-45. <https://doi.org/10.1038/35047123>.
- Herb, Marc. 2020. « LC3-Associated Phagocytosis - The Highway to Hell for Phagocytosed Microbes ». *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9.
- Herndon, Christopher M., et Dawn M. Dankenbring. 2014. « Patient Perception and Knowledge of Acetaminophen in a Large Family Medicine Service ». *Journal of Pain & Palliative Care Pharmacotherapy* 28 (2): 109-16. <https://doi.org/10.3109/15360288.2014.908993>.
- Hers, H G. 1963. « A-Glucosidase Deficiency in Generalized Glycogen-Storage Disease (Pompe's Disease) » 86: 6.
- Hesse, Matthias, Manuel Modolell, Anne C. La Flamme, Marco Schito, José Manuel Fuentes, Allen W. Cheever, Edward J. Pearce, et Thomas A. Wynn. 2001. « Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of l-Arginine Metabolism ». *The Journal of Immunology* 167 (11): 6533-44. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6533>.
- Hoeffel, Guillaume, et Florent Ginhoux. 2018. « Fetal Monocytes and the Origins of Tissue-Resident Macrophages ». *Cellular Immunology* 330 (août): 5-15. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.001>.
- Holt, Michael P., LinLing Cheng, et Cynthia Ju. 2008. « Identification and Characterization of Infiltrating Macrophages in Acetaminophen-Induced Liver Injury ». *Journal of Leukocyte Biology* 84 (6): 1410-21. <https://doi.org/10.1189/jlb.0308173>.

- Honey, Karen, et Alexander Y. Rudensky. 2003. «Lysosomal Cysteine Proteases Regulate Antigen Presentation». *Nature Reviews Immunology* 3 (6): 472-82. <https://doi.org/10.1038/nri1110>.
- Hong, Cynthia. s. d. «Liver X Receptors in Lipid Metabolism: Opportunities for Drug Discovery». *DRUG DISCOVERY*, 12.
- Hooftman, Alexander, et Luke A.J. O'Neill. 2019. «The Immunomodulatory Potential of the Metabolite Itaconate». *Trends in Immunology* 40 (8): 687-98. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.007>.
- Horckmans, Michael, Larisa Ring, Johan Duchene, Donato Santovito, Maximilian J. Schloss, Maik Drechsler, Christian Weber, Oliver Soehnlein, et Sabine Steffens. 2016. «Neutrophils Orchestrate Post-Myocardial Infarction Healing by Polarizing Macrophages towards a Reparative Phenotype». *European Heart Journal*, février, ehw002. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw002>.
- Hotamisligil, Gökhan S. 2006. «Inflammation and Metabolic Disorders». *Nature* 444 (7121): 860-67. <https://doi.org/10.1038/nature05485>.
- Hotchkiss, Richard S., Craig M. Coopersmith, Jonathan E. McDunn, et Thomas A. Ferguson. 2009. «The Sepsis Seesaw: Tilting toward Immunosuppression». *Nature Medicine* 15 (5): 496-97. <https://doi.org/10.1038/nm0509-496>.
- Hotchkiss, Richard S., Guillaume Monneret, et Didier Payen. 2013. «Sepsis-Induced Immunosuppression: From Cellular Dysfunctions to Immunotherapy». *Nature Reviews Immunology* 13 (12): 862-74. <https://doi.org/10.1038/nri3552>.
- Hotchkiss, Richard S., Stephen B. Osmon, Katherine C. Chang, Tracey H. Wagner, Craig M. Coopersmith, et Irene E. Karl. 2005. «Accelerated Lymphocyte Death in Sepsis Occurs by Both the Death Receptor and Mitochondrial Pathways». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (8): 5110-18. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.5110>.
- Houten, Sander Michel, et Ronald J. A. Wanders. 2010. «A General Introduction to the Biochemistry of Mitochondrial Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33 (5): 469-77. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9061-2>.
- Hoyer, Friedrich Felix, Kamila Naxerova, Maximilian J. Schloss, Maarten Hulsmans, Anil V. Nair, Partha Dutta, David M. Calcagno, et al. 2019. «Tissue-Specific Macrophage Responses to Remote Injury Impact the Outcome of Subsequent Local Immune Challenge». *Immunity* 51 (5): 899-914.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.10.010>.
- Huang, Stanley Ching-Cheng, Bart Everts, Yulia Ivanova, David O'Sullivan, Marcia Nascimento, Amber M Smith, Wandy Beatty, et al. 2014. «Cell-Intrinsic Lysosomal Lipolysis Is Essential for Alternative Activation of Macrophages». *Nature Immunology* 15 (9): 846-55. <https://doi.org/10.1038/ni.2956>.
- Huang, Wenchang, Yaoqing Tang, et Lei Li. 2010. «HMGB1, a Potent Proinflammatory Cytokine in Sepsis». *Cytokine* 51 (2): 119-26. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.02.021>.
- Huang, Y., H. Yin, J. Han, B. Huang, J. Xu, F. Zheng, Z. Tan, et al. 2007. «Extracellular Hmgb1 Functions as an Innate Immune-Mediator Implicated in Murine Cardiac Allograft Acute Rejection». *American Journal of Transplantation* 7 (4): 799-808. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01734.x>.
- Hübner, Marc P., Laura E. Layland, et Achim Hoerauf. 2013. «Helminths and Their Implication in Sepsis - a New Branch of Their Immunomodulatory Behaviour?» *Pathogens and Disease* 69 (2): 127-41. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12080>.
- Huebener, Peter, Geum-Youn Gwak, Jean-Philippe Pradere, Catarina M. Quinzii, Richard Friedman, Chyuan-Sheng Lin, Chad M. Trent, et al. 2014. «High-Mobility Group Box 1 Is Dispensable for Autophagy, Mitochondrial Quality Control, and Organ Function in Vivo». *Cell Metabolism* 19 (3): 539-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.014>.
- Ihle, James N. 2001. «The Stat Family in Cytokine Signaling». *Current Opinion in Cell Biology* 13 (2): 211-17. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00199-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00199-X).
- Inoki, Ken, Jounge Mok Kim, et Kun-Liang Guan. 2012. «AMPK and MTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 52 (1): 381-400. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537>.
- Ito, Ichiaki, Jutarou Fukazawa, et Michiteru Yoshida. 2007. «Post-Translational Methylation of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Causes Its Cytoplasmic Localization in Neutrophils\*». *Journal of*

- Biological Chemistry* 282 (22): 16336-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608467200>.
- Ivanov, Stanimir S, et Craig R Roy. 2013. «Pathogen Signatures Activate a Ubiquitination Pathway That Modulates the Function of the Metabolic Checkpoint Kinase MTOR». *Nature Immunology* 14 (12): 1219-28. <https://doi.org/10.1038/ni.2740>.
- J. Hoogenraad, Michael T. Ryan, Nicholas. 2001. «Translocation of Proteins into Mitochondria». *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* 51 (6): 345-50. <https://doi.org/10.1080/152165401753366096>.
- Jaeschke, Hartmut, Mitchell R. McGill, et Anup Ramachandran. 2012. «Oxidant Stress, Mitochondria, and Cell Death Mechanisms in Drug-Induced Liver Injury: Lessons Learned from Acetaminophen Hepatotoxicity». *Drug Metabolism Reviews* 44 (1): 88-106. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.602688>.
- Jaeschke, Hartmut, C. David Williams, Anup Ramachandran, et Mary L. Bajt. 2012. «Acetaminophen Hepatotoxicity and Repair: The Role of Sterile Inflammation and Innate Immunity: Acetaminophen Hepatotoxicity and Repair». *Liver International* 32 (1): 8-20. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02501.x>.
- Jaguin, Marie, Noémie Houlbert, Olivier Fardel, et Valérie Lecœur. 2013. «Polarization Profiles of Human M-CSF-Generated Macrophages and Comparison of M1-Markers in Classically Activated Macrophages from GM-CSF and M-CSF Origin». *Cellular Immunology* 281 (1): 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.01.010>.
- James, Laura P., Philip R. Mayeux, et Jack A. Hinson. 2003. «Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity». *Drug Metabolism and Disposition* 31 (12): 1499-1506. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.12.1499>.
- Jankowski, Andrzej, Cameron C. Scott, et Sergio Grinstein. 2002. «Determinants of the Phagosomal PH in Neutrophils». *Journal of Biological Chemistry* 277 (8): 6059-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110059200>.
- Jha, Abhishek K., Stanley Ching-Cheng Huang, Alexey Sergushichev, Vicky Lampropoulou, Yulia Ivanova, Ekaterina Loginicheva, Karina Chmielewski, et al. 2015. «Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules That Regulate Macrophage Polarization». *Immunity* 42 (3): 419-30. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.005>.
- Joshi, S. R., Y. C. Sarpong, R. C. Peterson, et W. M. Scovell. 2012. «Nucleosome Dynamics: HMGB1 Relaxes Canonical Nucleosome Structure to Facilitate Estrogen Receptor Binding». *Nucleic Acids Research* 40 (20): 10161-71. <https://doi.org/10.1093/nar/gks815>.
- Ju, Cynthia, Timothy P. Reilly, Mohammed Bourdi, Michael F. Radonovich, John N. Brady, John W. George, et Lance R. Pohl. 2002. «Protective Role of Kupffer Cells in Acetaminophen-Induced Hepatic Injury in Mice». *Chemical Research in Toxicology* 15 (12): 1504-13. <https://doi.org/10.1021/tx0255976>.
- Kader, Muhamuda, Abdeljabar El Andaloussi, Jennie Vorhaour, Kenichi Tamama, Natalia Nieto, Melanie J. Scott, et Nahed Ismail. 2021. «Interferon Type I Regulates Inflammasome Activation and High Mobility Group Box 1 Translocation in Hepatocytes During *Ehrlichia* -Induced Acute Liver Injury». *Hepatology Communications* 5 (1): 33-51. <https://doi.org/10.1002/hep4.1608>.
- Kaiko, Gerard E, Jay C Horvat, Kenneth W Beagley, et M Hansbro. 2007. «Immunological Decision-making: How Does the Immune System Decide to Mount a Helper T-cell Response?», 13.
- Kang, Rui, Ruochan Chen, Qihong Zhang, Wen Hou, Sha Wu, Lizhi Cao, Jin Huang, et al. 2014. «HMGB1 in Health and Disease». *Molecular Aspects of Medicine* 40 (décembre): 1-116. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2014.05.001>.
- Kang, Rui, Kristen M. Livesey, Herbert J. Zeh, III, Michael T. Loze, et Daolin Tang. 2011. «Metabolic Regulation by HMGB1-Mediated Autophagy and Mitophagy». *Autophagy* 7 (10): 1256-58. <https://doi.org/10.4161/auto.7.10.16753>.
- Karakike, Eleni, et Evangelos J. Giamarellos-Bourboulis. 2019. «Macrophage Activation-Like Syndrome: A Distinct Entity Leading to Early Death in Sepsis». *Frontiers in Immunology* 10: 55. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00055>.
- Keiran, Noelia, Victoria Ceperuelo-Mallafré, Enrique Calvo, Maria Isabel Hernández-Alvarez, Miriam Ejarque, Catalina Núñez-Roa, Daniel Horrillo, et al. 2019. «SUCNR1 Controls an Anti-Inflammatory

- Program in Macrophages to Regulate the Metabolic Response to Obesity ». *Nature Immunology* 20 (5): 581-92. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0372-7>.
- Kelly, Beth, et Luke AJ O'Neill. 2015. « Metabolic Reprogramming in Macrophages and Dendritic Cells in Innate Immunity ». *Cell Research* 25 (7): 771-84. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.68>.
- Kelly, Beth, Gillian M. Tannahill, Michael P. Murphy, et Luke A. J. O'Neill. 2015. « Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Macrophages ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (33): 20348-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662114>.
- Kim, Jang Keun, et Jeong Ho Lee. 2019. « Mechanistic Target of Rapamycin Pathway in Epileptic Disorders ». *Journal of Korean Neurosurgical Society* 62 (3): 272-87. <https://doi.org/10.3340/jkns.2019.0027>.
- Kimura, Tetsuya, Shigeyuki Nada, Noriko Takegahara, Tatsusada Okuno, Satoshi Nojima, Sujin Kang, Daisuke Ito, et al. 2016. « Polarization of M2 Macrophages Requires Lamtor1 That Integrates Cytokine and Amino-Acid Signals ». *Nature Communications* 7 (1): 13130. <https://doi.org/10.1038/ncomms13130>.
- Kobayashi, Eri H., Takafumi Suzuki, Ryo Funayama, Takeshi Nagashima, Makiko Hayashi, Hiroki Sekine, Nobuyuki Tanaka, et al. 2016. « Nrf2 Suppresses Macrophage Inflammatory Response by Blocking Proinflammatory Cytokine Transcription ». *Nature Communications* 7 (1): 11624. <https://doi.org/10.1038/ncomms11624>.
- Kokkola, R., A. Andersson, G. Mullins, T. Ostberg, C.-J. Treutiger, B. Arnold, P. Nawroth, U. Andersson, R. A. Harris, et H. E. Harris. 2005. « RAGE Is the Major Receptor for the Proinflammatory Activity of HMGB1 in Rodent Macrophages ». *Scandinavian Journal of Immunology* 61 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2005.01534.x>.
- Kolios, George. 2006. « Role of Kupffer Cells in the Pathogenesis of Liver Disease ». *World Journal of Gastroenterology* 12 (46): 7413. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i46.7413>.
- Kong, Xiaoni, Rajesh Thimmulappa, Ponvijay Kombairaju, et Shyam Biswal. 2010. « NADPH Oxidase-Dependent Reactive Oxygen Species Mediate Amplified TLR4 Signaling and Sepsis-Induced Mortality in Nrf2-Deficient Mice ». *The Journal of Immunology* 185 (1): 569-77. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902315>.
- Korns, Darlynn, S. Courtney Frasch, Ruby Fernandez-Boyanapalli, Peter M. Henson, et Donna L. Bratton. 2011. « Modulation of Macrophage Efferocytosis in Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 2. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00057>.
- Kratz, Mario, Brittney R. Coats, Katherine B. Hisert, Derek Hagman, Vesco Mutskov, Eduard Peris, Kelly Q. Schoenfelt, et al. 2014. « Metabolic Dysfunction Drives a Mechanistically Distinct Proinflammatory Phenotype in Adipose Tissue Macrophages ». *Cell Metabolism* 20 (4): 614-25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.010>.
- Krausgruber, Thomas, Katrina Blazek, Tim Smallie, Saba Alzabin, Helen Lockstone, Natasha Sahgal, Tracy Hussell, Marc Feldmann, et Irina A Udalova. 2011. « IRF5 Promotes Inflammatory Macrophage Polarization and TH1-TH17 Responses ». *Nature Immunology* 12 (3): 231-38. <https://doi.org/10.1038/ni.1990>.
- Krenkel, Oliver, Jana C Mossanen, et Frank Tacke. 2014. « Immune Mechanisms in Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure ». *HepatoBiliary Surgery and Nutrition* 3 (6): 13.
- Kugler, Jamie E., Marion Horsch, Di Huang, Takashi Furusawa, Mark Rochman, Lillian Garrett, Lore Becker, et al. 2013. « High Mobility Group N Proteins Modulate the Fidelity of the Cellular Transcriptional Profile in a Tissue- and Variant-Specific Manner\* ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (23): 16690-703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.463315>.
- Kujoth, Gregory C., Christiaan Leeuwenburgh, et Tomas A. Prolla. 2006. « Mitochondrial DNA Mutations and Apoptosis in Mammalian Aging: Figure 1. ». *Cancer Research* 66 (15): 7386-89. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4670>.
- Kwon, Da Hye, Hyesook Lee, Cheol Park, Su-Hyun Hong, Sang Hoon Hong, Gi-Young Kim, Hee-Jae Cha, et al. 2019. « Glutathione Induced Immune-Stimulatory Activity by Promoting M1-Like Macrophages Polarization via Potential ROS Scavenging Capacity ». *Antioxidants* 8 (9): 413. <https://doi.org/10.3390/antiox8090413>.

- Laffel, Lori. 1999. « Ketone Bodies: A Review of Physiology, Pathophysiology and Application of Monitoring to Diabetes ». *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 15 (6): 412-26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-7560\(199911/12\)15:6<412::AID-DMRR72>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-7560(199911/12)15:6<412::AID-DMRR72>3.0.CO;2-8).
- Lambeth, J. David. 2004. « NOX Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen ». *Nature Reviews Immunology* 4 (3): 181-89. <https://doi.org/10.1038/nri1312>.
- Lampropoulou, Vicky, Alexey Sergushichev, Monika Bambouskova, Sharmila Nair, Emma E. Vincent, Ekaterina Loginicheva, Luisa Cervantes-Barragan, et al. 2016. « Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation ». *Cell metabolism* 24 (1): 158-66. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.004>.
- Lange, Sabine S., David L. Mitchell, et Karen M. Vasquez. 2008. « High Mobility Group Protein B1 Enhances DNA Repair and Chromatin Modification after DNA Damage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (30): 10320-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803181105>.
- Lantz, Connor, Behram Radmanesh, Esther Liu, Edward B. Thorp, et Jennie Lin. 2020. « Single-Cell RNA Sequencing Uncovers Heterogenous Transcriptional Signatures in Macrophages during Efferocytosis ». *Scientific Reports* 10 (1): 14333. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70353-y>.
- Laplante, M., et D. M. Sabatini. 2009. « mTOR Signaling at a Glance ». *Journal of Cell Science* 122 (20): 3589-94. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>.
- Laplante, Mathieu, et David M. Sabatini. 2012. « mTOR Signaling in Growth Control and Disease ». *Cell* 149 (2): 274-93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.
- Larson, Anne M., Julie Polson, Robert J. Fontana, Timothy J. Davern, Ezmina Lalani, Linda S. Hynan, Joan S. Reisch, et al. 2005. « Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure: Results of a United States Multicenter, Prospective Study ». *Hepatology* 42 (6): 1364-72. <https://doi.org/10.1002/hep.20948>.
- Lauterbach, Mario A., Jasmin E. Hanke, Magdalini Serefidou, Matthew S.J. Mangan, Carl-Christian Kolbe, Timo Hess, Maximilian Rothe, et al. 2019. « Toll-like Receptor Signaling Rewires Macrophage Metabolism and Promotes Histone Acetylation via ATP-Citrate Lyase ». *Immunity* 51 (6): 997-1011.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.11.009>.
- Lavin, Yonit, Deborah Winter, Ronnie Blecher-Gonen, Eyal David, Hadas Keren-Shaul, Miriam Merad, Steffen Jung, et Ido Amit. 2014. « Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment ». *Cell* 159 (6): 1312-26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>.
- Lawrence, Toby, et Gioacchino Natoli. 2011. « Transcriptional Regulation of Macrophage Polarization: Enabling Diversity with Identity ». *Nature Reviews Immunology* 11 (11): 750-61. <https://doi.org/10.1038/nri3088>.
- Lefèvre, Lise, Hélène Authier, Sokrates Stein, Clarisse Majorel, Bettina Couderc, Christophe Dardenne, Mohamad Ala Eddine, et al. 2015. « LXR-1 Mediates Anti-Inflammatory and Antifungal Phenotype of IL-13-Activated Macrophages through the PPAR $\gamma$  Ligand Synthesis ». *Nature Communications* 6 (1): 6801. <https://doi.org/10.1038/ncomms7801>.
- Lehtonen, Sanna, et Eero Lehtonen. 2001. « HMG-17 Is an Early Marker of Inductive Interactions in the Developing Mouse Kidney ». *Differentiation* 67 (4-5): 154-63. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.670407.x>.
- Lemke, Greg. 2019. « How Macrophages Deal with Death ». *Nature Reviews Immunology* 19 (9): 539-49. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0167-y>.
- Lf, Prescott. 1980. « Hepatotoxicity of Mild Analgesics ». *British Journal of Clinical Pharmacology*. Br J Clin Pharmacol. octobre 1980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1980.tb01825.x>.
- Li, Chuan, Antoine Menoret, Cullen Farragher, Zhengqing Ouyang, Christopher Bonin, Paul Holvoet, Anthony T. Vella, et Beiyan Zhou. 2019. « Single-Cell Transcriptomics-Based MacSpectrum Reveals Macrophage Activation Signatures in Diseases ». *JCI Insight* 4 (10): e126453. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126453>.
- Li, Nianyu, Kathy Ragheb, Gretchen Lawler, Jennie Sturgis, Bartek Rajwa, J. Andres Melendez, et J. Paul Robinson. 2003. « Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species

- Production ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 8516-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210432200>.
- Li, Yingke, Peng Zhang, Chengcai Wang, Chaofeng Han, Jun Meng, Xingguang Liu, Sheng Xu, et al. 2013. « Immune Responsive Gene 1 (IRG1) Promotes Endotoxin Tolerance by Increasing A20 Expression in Macrophages through Reactive Oxygen Species ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (23): 16225-34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.454538>.
- Liang, Stephen Y. 2016. « Sepsis and Other Infectious Disease Emergencies in the Elderly ». *Emergency Medicine Clinics of North America* 34 (3): 501-22. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2016.04.005>.
- Lieberman, Andrew P, Rosa Puertollano, Nina Raben, Susan Slauchaupt, Steven U Walkley, et Andrea Ballabio. s. d. « Autophagy in Lysosomal Storage Disorders » 8 (5): 13.
- Little, Alicia J., Elizabeth Corbett, Fabian Ortega, et David G. Schatz. 2013. « Cooperative Recruitment of HMGB1 during V(D)J Recombination through Interactions with RAG1 and DNA ». *Nucleic Acids Research* 41 (5): 3289-3301. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1461>.
- Liu, Bin, Johan Palmfeldt, Lin Lin, Alexandria Colaço, Knut K. B. Clemmensen, Jinrong Huang, Fengping Xu, et al. 2018. « STAT3 Associates with Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and Regulates Cytosolic and Lysosomal PH ». *Cell Research* 28 (10): 996-1012. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0080-0>.
- Liu, Gang, Jing Wang, Young-Jun Park, Yuko Tsuruta, Emmanuel F. Lorne, Xia Zhao, et Edward Abraham. 2008. « High Mobility Group Protein-1 Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils through Binding to Phosphatidylserine ». *The Journal of Immunology* 181 (6): 4240-46. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.4240>.
- Liu, Gang, Jing Wang, Young-Jun Park, Yuko Tsuruta, Emmanuel F. Lorne, Xia Zhao, et Edward Abraham. 2009. « HMGB1 Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils through Binding to Phosphatidylserine », 18.
- Liu, Na, Jing Luo, Dong Kuang, Sanpeng Xu, Yaqi Duan, Yu Xia, Zhengping Wei, et al. 2019. « Lactate Inhibits ATP6V0d2 Expression in Tumor-Associated Macrophages to Promote HIF-2 $\alpha$ -Mediated Tumor Progression ». *Journal of Clinical Investigation* 129 (2): 631-46. <https://doi.org/10.1172/JCI123027>.
- Liu, Pu-Ste, Haiping Wang, Xiaoyun Li, Tung Chao, Tony Teav, Stefan Christen, Giusy Di Conza, et al. 2017. «  $\alpha$ -Ketoglutarate Orchestrates Macrophage Activation through Metabolic and Epigenetic Reprogramming ». *Nature Immunology* 18 (9): 985-94. <https://doi.org/10.1038/ni.3796>.
- Liu, Ting, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, et Shao-Cong Sun. 2017. « NF-KB Signaling in Inflammation ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2 (1): 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- Liu, Wenli, Chenji Ye, Qian Cheng, Xuejiao Zhang, Liu Yao, Qi Li, Jing Huang, et al. 2019. « Macrophage Raptor Deficiency-Induced Lysosome Dysfunction Exacerbates Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 7 (1): 211-31. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.09.011>.
- Livesey, Kristen M, Rui Kang, Philip Vernon, William Buchser, Patricia Loughran, Simon C Watkins, Lin Zhang, et al. s. d. « P53/HMGB1 Complexes Regulate Autophagy and Apoptosis ». *Cancer Research*, 11.
- Lolmede, Karine, Lara Campana, Michela Vezzoli, Lidia Bosurgi, Rossana Tonlorenzi, Emilio Clementi, Marco E. Bianchi, et al. 2009. « Inflammatory and Alternatively Activated Human Macrophages Attract Vessel-Associated Stem Cells, Relying on Separate HMGB1- and MMP-9-Dependent Pathways ». *Journal of Leukocyte Biology* 85 (5): 779-87. <https://doi.org/10.1189/jlb.0908579>.
- London, Nyall R., Weiquan Zhu, Fernando A. Bozza, Matthew C. P. Smith, Daniel M. Greif, Lise K. Sorensen, Luming Chen, et al. 2010. « Targeting Robo4-Dependent Slit Signaling to Survive the Cytokine Storm in Sepsis and Influenza ». *Science Translational Medicine* 2 (23): 23ra19. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000678>.
- Lopes, Rui, Reuven Agami, et Gozde Korkmaz. 2017. « GRO-Seq, A Tool for Identification of Transcripts Regulating Gene Expression ». In *Promoter Associated RNA*, édité par Sara Napoli, 1543:45-55. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6716-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6716-2_3).
- Lu, Ben, Daniel J. Antoine, Kevin Kwan, Peter Lundbäck, Heidi Wähämaa, Hanna Schierbeck, Melissa Robinson, et al. 2014. « JAK/STAT1 signaling promotes

- HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (8): 3068-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316925111>.
- Lu, Ben, Takahisa Nakamura, Karen Inouye, Jianhua Li, Yiting Tang, Peter Lundbäck, Sergio I. Valdes-Ferrer, et al. 2012. « Novel Role of PKR in Inflammasome Activation and HMGB1 Release ». *Nature* 488 (7413): 670-74. <https://doi.org/10.1038/nature11290>.
- Lund, Terje, Jostein Holtlund, Marianne Fredriksen, et Søren G. Laland. 1983. « On the Presence of Two New High Mobility Group-like Proteins in HeLa S3 Cells ». *FEBS Letters* 152 (2): 163-67. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80370-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(83)80370-6).
- Luo, Shiyu, C. Alexander Valencia, Jinglan Zhang, Ni-Chung Lee, Jesse Slone, Baoheng Gui, Xinjian Wang, et al. 2018. « Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (51): 13039-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>.
- MacDonald, Julie A., Alisha M. Bothun, Sofia N. Annis, Hannah Sheehan, Somak Ray, Yuanwei Gao, Alexander R. Ivanov, Konstantin Khrapko, Jonathan L. Tilly, et Dori C. Woods. 2019. « A Nanoscale, Multi-Parametric Flow Cytometry-Based Platform to Study Mitochondrial Heterogeneity and Mitochondrial DNA Dynamics ». *Communications Biology* 2 (1): 258. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0513-4>.
- Mantovani, A, A Sica, S Sozzani, P Allavena, A Vecchi, et M Locati. 2004. « The Chemokine System in Diverse Forms of Macrophage Activation and Polarization ». *Trends in Immunology* 25 (12): 677-86. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.
- Martano, Giuseppe, Nathanaël Delmotte, Patrick Kiefer, Philipp Christen, David Kentner, Dirk Bumann, et Julia A Vorholt. 2015. « Fast Sampling Method for Mammalian Cell Metabolic Analyses Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry ». *Nature Protocols* 10 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.198>.
- Martin, Paul. 1997. « Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration ». *Science* 276 (5309): 75-81. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.75>.
- Martina, Jose A, Yong Chen, Marjan Gucek, et Rosa Puertollano. s. d. « MTORC1 Functions as a Transcriptional Regulator of Autophagy by Preventing Nuclear Transport of TFEB » 8 (6): 13.
- Martinez, Fernando O., et Siamon Gordon. 2014. « The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment ». *F1000Prime Reports* 6 (mars). <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
- Martínez-Reyes, Inmaculada, et Navdeep S. Chandel. 2020. « Mitochondrial TCA Cycle Metabolites Control Physiology and Disease ». *Nature Communications* 11 (1): 102. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>.
- Mathias, Brittany, Benjamin E. Szpila, Frederick A. Moore, Philip A. Efron, et Lyle L. Moldawer. 2015. « A Review of GM-CSF Therapy in Sepsis ». *Medicine* 94 (50): e2044. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002044>.
- Mayr, Johannes A. 2015. « Lipid Metabolism in Mitochondrial Membranes ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 38 (1): 137-44. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9748-x>.
- McGill, Mitchell R., et Hartmut Jaeschke. 2013. « Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis ». *Pharmaceutical Research* 30 (9): 2174-87. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1007-6>.
- McKinney, Kristine, et Carol Prives. 2002. « Efficient Specific DNA Binding by P53 Requires Both Its Central and C-Terminal Domains as Revealed by Studies with High-Mobility Group 1 Protein ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (19): 6797-6808. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.19.6797-6808.2002>.
- Mederacke, Ingmar, Christine C. Hsu, Juliane S. Troeger, Peter Huebener, Xueru Mu, Dianne H. Dapito, Jean-Philippe Pradere, et Robert F. Schwabe. 2013. « Fate Tracing Reveals Hepatic Stellate Cells as Dominant Contributors to Liver Fibrosis Independent of Its Aetiology ». *Nature Communications* 4 (1): 2823. <https://doi.org/10.1038/ncomms3823>.
- Medzhitov, Ruslan, et Charles Janeway, Jr. 2000. « The Toll Receptor Family and Microbial Recognition ». *Trends in Microbiology* 8 (10): 452-56. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01845-X](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01845-X).
- Mehta, Manan M., Samuel E. Weinberg, et Navdeep S. Chandel. 2017. « Mitochondrial Control of Immunity: Beyond ATP ». *Nature*



- Reviews Immunology* 17 (10): 608-20. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.66>.
- Mehta, Puja, Daniel F McAuley, Michael Brown, Emilie Sanchez, Rachel S Tattersall, et Jessica J Manson. 2020. « COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression ». *Lancet (London, England)* 395 (10229): 1033-34. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0).
- Meisel, Christian, Joerg C. Schefold, Rene Pschowski, Tycho Baumann, Katrin Hetzger, Jan Gregor, Steffen Weber-Carstens, et al. 2009. « Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor to Reverse Sepsis-Associated Immunosuppression: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Multicenter Trial ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180 (7): 640-48. <https://doi.org/10.1164/rccm.200903-0363OC>.
- Mercalli, Alessia, Ines Calavita, Erica Dugnani, Antonio Citro, Elisa Cantarelli, Rita Nano, Raffaella Melzi, et al. 2013. « Rapamycin Unbalances the Polarization of Human Macrophages to M1 ». *Immunology* 140 (2): 179-90. <https://doi.org/10.1111/imm.12126>.
- Merenmies, J., R. Pihlaskari, J. Laitinen, J. Wartiovaara, et H. Rauvala. 1991. « 30-KDa Heparin-Binding Protein of Brain (Amphoterin) Involved in Neurite Outgrowth. Amino Acid Sequence and Localization in the Filopodia of the Advancing Plasma Membrane. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (25): 16722-29. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55361-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55361-8).
- Messmer, Davorka, Huan Yang, Gloria Telusma, Faye Knoll, Jianhua Li, Bradley Messmer, Kevin J. Tracey, et Nicholas Chiorazzi. 2004. « High Mobility Group Box Protein 1: An Endogenous Signal for Dendritic Cell Maturation and Th1 Polarization ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (1): 307-13.
- Miao, Jifei, Sen Ye, Jiao Lan, Peng Ye, Quan Wen, Liyan Mei, Xia Liu, et al. 2020. « Nuclear HMGB1 Promotes the Phagocytic Ability of Macrophages ». *Experimental Cell Research* 393 (1): 112037. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112037>.
- Michalopoulos, George K. 2020. « Liver Regeneration ». In *The Liver*, édité par Irwin M. Arias, Harvey J. Alter, James L. Boyer, David E. Cohen, David A. Shafritz, Snorri S. Thorgeirsson, et Allan W. Wolkoff, 1<sup>re</sup> éd., 566-84. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119436812.ch45>.
- Mills, Charles D., Kristi Kincaid, Jennifer M. Alt, Michelle J. Heilman, et Annette M. Hill. 2000. « M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm ». *The Journal of Immunology* 164 (12): 6166-73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>.
- Mills, Evanna L., Beth Kelly, Angela Logan, Ana S.H. Costa, Mukund Varma, Clare E. Bryant, Panagiotis Tourlomis, et al. 2016. « Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages ». *Cell* 167 (2): 457-470.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.064>.
- Mills, Evanna L., et Luke A. O'Neill. 2016. « Reprogramming Mitochondrial Metabolism in Macrophages as an Anti-Inflammatory Signal: HIGHLIGHTS ». *European Journal of Immunology* 46 (1): 13-21. <https://doi.org/10.1002/eji.201445427>.
- Mills, Evanna L., Dylan G. Ryan, Hiran A. Prag, Dina Dikovskaya, Deepthi Menon, Zbigniew Zaslona, Mark P. Jedrychowski, et al. 2018. « Itaconate Is an Anti-Inflammatory Metabolite That Activates Nrf2 via Alkylation of KEAP1 ». *Nature* 556 (7699): 113-17. <https://doi.org/10.1038/nature25986>.
- Min, Byong-Keol, Sungmi Park, Hyeon-Ji Kang, Dong Wook Kim, Hye Jin Ham, Chae-Myeong Ha, Byung-Jun Choi, et al. 2019. « Pyruvate Dehydrogenase Kinase Is a Metabolic Checkpoint for Polarization of Macrophages to the M1 Phenotype ». *Frontiers in Immunology* 10 (mai): 944. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00944>.
- Min, Sang Hee, Aae Suzuki, Lehn Weaver, Jessica Guzman, Yutein Chung, Huiyan Jin, Francina Gonzalez, et al. 2019. « PIKfyve Deficiency in Myeloid Cells Impairs Lysosomal Homeostasis in Macrophages and Promotes Systemic Inflammation in Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 39 (21): 17.
- Minhas, Paras S., Ling Liu, Peter K. Moon, Amit U. Joshi, Christopher Dove, Siddhita Mhatre, Kevin Contrepois, et al. 2019. « Macrophage de novo NAD<sup>+</sup> synthesis specifies immune function in aging and inflammation ». *Nature immunology* 20 (1): 50-63. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0255-3>.
- Mosser, David M., et Justin P. Edwards. 2008. « Exploring the Full Spectrum of

- Macrophage Activation ». *Nature Reviews Immunology* 8 (12): 958-69. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- Murray, Peter J., et Thomas A. Wynn. 2011. « Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets ». *Nature Reviews Immunology* 11 (11): 723-37. <https://doi.org/10.1038/nri3073>.
- Murray, Peter J., Judith E. Allen, Subhra K. Biswas, Edward A. Fisher, Derek W. Gilroy, Sergij Goerdt, Siamon Gordon, et al. 2014. « Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines ». *Immunity* 41 (1): 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>.
- Najima, Yuho, Naoya Yahagi, Yoshinori Takeuchi, Takashi Matsuzaka, Motohiro Sekiya, Yoshimi Nakagawa, Michiyo Amemiya-Kudo, et al. 2005. « High Mobility Group Protein-B1 Interacts with Sterol Regulatory Element-Binding Proteins to Enhance Their DNA Binding ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (30): 27523-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414549200>.
- Nakadera, Eisuke, Shunhei Yamashina, Kousuke Izumi, Yoshihiro Inami, Toshifumi Sato, Hirofumi Fukushima, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Takashi Ueno, et Sumio Watanabe. 2016. « Inhibition of MTOR Improves the Impairment of Acidification in Autophagic Vesicles Caused by Hepatic Steatosis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469 (4): 1104-10. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.010>.
- Nakahira, Kiichi, Jeffrey Adam Haspel, Vijay AK Rathinam, Seon-Jin Lee, Tamas Dolinay, Hilaire C Lam, Joshua A Englert, et al. 2011. « Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release ». *Nature immunology* 12 (3): 222-30. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
- Namgaladze, Dmitry, et Bernhard Brüne. 2014. « Fatty Acid Oxidation Is Dispensable for Human Macrophage IL-4-Induced Polarization ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (9): 1329-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.06.007>.
- Nathan, Carl. 2002. « Points of Control in Inflammation ». *Nature* 420 (6917): 846-52. <https://doi.org/10.1038/nature01320>.
- Nedeva, Christina, Joseph Menassa, et Hamsa Puthalakath. 2019. « Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00108>.
- Nixon, Ralph A. 2013. « The Role of Autophagy in Neurodegenerative Disease ». *Nature Medicine* 19 (8): 15.
- Nomura, Mitsunori, Jie Liu, Ilsa I Rovira, Elsie Gonzalez-Hurtado, Jieun Lee, Michael J Wolfgang, et Toren Finkel. 2016. « Fatty acid oxidation in macrophage polarization ». *Nature immunology* 17 (3): 216-17. <https://doi.org/10.1038/ni.3366>.
- Ogawa, Sumito, Jean Lozach, Chris Benner, Gabriel Pascual, Stefan Westin, Alexander Hoffmann, Shankar Subramaniam, Michael G Rosenfeld, et Christopher K Glass. 2006. « Molecular Determinants of Crosstalk between Nuclear Receptors and Toll-like Receptors Mediating Counter-Regulation of Inflammatory Responses », 30.
- Ohtani, Masashi, Takayuki Hoshii, Hideki Fujii, Shigeo Koyasu, Atsushi Hirao, et Satoshi Matsuda. 2012. « Cutting Edge: mTORC1 in Intestinal CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Dendritic Cells Regulates Intestinal Homeostasis by Promoting IL-10 Production ». *The Journal of Immunology* 188 (10): 4736-40. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200069>.
- Okada, Masahiro, Atsushi Matsuzawa, Akihiko Yoshimura, et Hidenori Ichijo. 2014. « The Lysosome Rupture-Activated TAK1-JNK Pathway Regulates NLRP3 Inflammasome Activation » 289 (47): 12.
- Osellame, Laura D, et Michael R Duchon. 2013. « Defective Quality Control Mechanisms and Accumulation of Damaged Mitochondria Link Gaucher and Parkinson Diseases ». *Autophagy* 9 (10): 1633-35. <https://doi.org/10.4161/auto.25878>.
- Owen, Mark R, Elena Doran, et Andrew P Halestrap. 2000. « Evidence That Metformin Exerts Its Anti-Diabetic Effects through Inhibition of Complex 1 of the Mitochondrial Respiratory Chain », 8.
- Palsson-McDermott, Eva M., et Luke A. J. O'Neill. 2013. « The Warburg Effect Then and Now: From Cancer to Inflammatory Diseases: Review Essays ». *BioEssays* 35 (11): 965-73. <https://doi.org/10.1002/bies.201300084>.
- Palsson-McDermott, Eva M., Anne M. Curtis, Gautam Goel, Mario A. R. Lauterbach, Frederick J. Sheedy, Laura E. Gleeson, Mirjam W. M. van den Bosch, et al. 2015. « Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 $\alpha$  Activity and IL-1 $\beta$  Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages ». *Cell Metabolism* 21 (1): 65-80.

- <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.005>
- Parodi, Benedetta, Silvia Rossi, Sara Morando, Christian Cordano, Alberto Bragoni, Caterina Motta, Cesare Usai, et al. 2015. « Fumarates Modulate Microglia Activation through a Novel HCAR2 Signaling Pathway and Rescue Synaptic Dysregulation in Inflamed CNS ». *Acta Neuropathologica* 130 (2): 279-95. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1422-3>.
- Pastore, Nunzia, Owen A. Brady, Heba I. Diab, José A. Martina, Lu Sun, Tuong Huynh, Jeong-A Lim, et al. 2016. « TFEB and TFE3 Cooperate in the Regulation of the Innate Immune Response in Activated Macrophages ». *Autophagy* 12 (8): 1240-58. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1179405>.
- Pearce, Erika L., et Edward J. Pearce. 2013. « Metabolic Pathways In Immune Cell Activation And Quiescence ». *Immunity* 38 (4): 633-43. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>.
- Pearce, Erika L, Maya C Poffenberger, Chih-Hao Chang, et Russell G Jones. 2013. « Fueling Immunity: Insights into Metabolism and Lymphocyte Function » 342: 13.
- Peck-Palmer, Octavia M., Jacqueline Unsinger, Katherine C. Chang, Jacquelyn S. McDonough, Harris Perlman, Jonathan E. McDunn, et Richard S. Hotchkiss. 2009. « Modulation of the Bcl-2 Family Blocks Sepsis-Induced Depletion of Dendritic Cells and Macrophages ». *Shock (Augusta, Ga.)* 31 (4): 359-66. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31818ba2a2>.
- Peña-Llopis, Samuel, Silvia Vega-Rubin-de-Celis, Jacob C Schwartz, Nicholas C Wolff, Tram Anh T Tran, Lihua Zou, Xian-Jin Xie, David R Corey, et James Brugarolas. 2011. « Regulation of TFEB and V-ATPases by MTORC1: Regulation of TFEB and V-ATPases by MTORC1 ». *The EMBO Journal* 30 (16): 3242-58. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.257>.
- Pernas, Lena, Camilla Bean, John C. Boothroyd, et Luca Scorrano. 2018. « Mitochondria Restrict Growth of the Intracellular Parasite *Toxoplasma Gondii* by Limiting Its Uptake of Fatty Acids ». *Cell Metabolism* 27 (4): 886-897.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.018>.
- Personnaz, Jean, Enzo Piccolo, Alizee Dortignac, Jason S Iacovoni, Jerome Mariette, Arnaud Polizzi, Aurelie Batut, et al. 2021. « Nuclear HMGB1 Protects from Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases through Negative Regulation of Liver X Receptor ». Preprint. Pathology. <https://doi.org/10.1101/2021.02.17.431446>
- Peyssonnaux, Carole, Vivekanand Datta, Thorsten Cramer, Andrew Doedens, Emmanuel A. Theodorakis, Richard L. Gallo, Nancy Hurtado-Ziola, Victor Nizet, et Randall S. Johnson. 2005. « HIF-1 $\alpha$  Expression Regulates the Bactericidal Capacity of Phagocytes ». *Journal of Clinical Investigation* 115 (7): 1806-15. <https://doi.org/10.1172/JCI23865>.
- Pfefferli, Catherine, et Anna Jazwińska. 2015. « The art of fin regeneration in zebrafish ». *Regeneration* 2 (2): 72-83. <https://doi.org/10.1002/reg2.33>.
- Phair, Robert D., Paola Scaffidi, Cem Elbi, Jaromíra Vecerová, Anup Dey, Keiko Ozato, David T. Brown, Gordon Hager, Michael Bustin, et Tom Misteli. 2004. « Global Nature of Dynamic Protein-Chromatin Interactions In Vivo: Three-Dimensional Genome Scanning and Dynamic Interaction Networks of Chromatin Proteins ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (14): 6393-6402. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.14.6393-6402.2004>.
- Picard, Martin, Douglas C. Wallace, et Yan Burelle. 2016. « The Rise of Mitochondria in Medicine ». *Mitochondrion* 30 (septembre): 105-16. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.003>
- Pickles, Sarah, Pierre Vigié, et Richard J. Youle. 2018. « Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance ». *Current Biology* 28 (4): R170-85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>.
- Polanská, Eva, Zuzana Dobšáková, Martina Dvořáčková, Jiří Fajkus, et Michal Štros. 2012. « HMGB1 Gene Knockout in Mouse Embryonic Fibroblasts Results in Reduced Telomerase Activity and Telomere Dysfunction ». *Chromosoma* 121 (4): 419-31. <https://doi.org/10.1007/s00412-012-0373-x>.
- Polat, Gizem, Rustem Anil Ugan, Elif Cadirci, et Zekai Halici. 2017. « Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches ». *The Eurasian Journal of Medicine* 49 (1): 53-58. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2017.17062>.

- Poss, K. D. 2002. «Heart Regeneration in Zebrafish». *Science* 298 (5601): 2188-90. <https://doi.org/10.1126/science.1077857>.
- Pradere, Jean-Philippe, Johannes Kluwe, Samuele De Minicis, Jing-Jing Jiao, Geum-Youn Gwak, Dianne H. Dapito, Myoung-Kuk Jang, et al. 2013. «Hepatic Macrophages but Not Dendritic Cells Contribute to Liver Fibrosis by Promoting the Survival of Activated Hepatic Stellate Cells in Mice: Hepatology, Vol. 57, No. X, 2013». *Hepatology* 58 (4): 1461-73. <https://doi.org/10.1002/hep.26429>.
- Puertollano, Rosa, Shawn M Ferguson, James Brugarolas, et Andrea Ballabio. 2018. «The Complex Relationship between TFEB Transcription Factor Phosphorylation and Subcellular Localization». *The EMBO Journal* 37 (11). <https://doi.org/10.15252/emj.201798804>.
- Pugh, Christopher W, et Peter J Ratcliffe. 2003. «Regulation of Angiogenesis by Hypoxia: Role of the HIF System». *Nature Medicine* 9 (6): 677-84. <https://doi.org/10.1038/nm0603-677>.
- Rabadi, May M., Sandhya Xavier, Radovan Vasko, Kavneet Kaur, Michael S. Goligorsky, et Brian B. Ratliff. 2015. «High-Mobility Group Box 1 Is a Novel Deacetylation Target of Sirtuin1». *Kidney International* 87 (1): 95-108. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.217>.
- Ramachandran, Anup, Margitta Lebofsky, Steven A. Weinman, et Hartmut Jaeschke. 2011. «The Impact of Partial Manganese Superoxide Dismutase (SOD2)-Deficiency on Mitochondrial Oxidant Stress, DNA Fragmentation and Liver Injury during Acetaminophen Hepatotoxicity». *Toxicology and Applied Pharmacology* 251 (3): 226-33. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.01.004>.
- Ramachandran, P., et J. P. Iredale. 2012. «Liver Fibrosis: A Bidirectional Model of Fibrogenesis and Resolution». *QJM* 105 (9): 813-17. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcs069>.
- Ramond, Elodie, Anne Jamet, Mathieu Coureuil, et Alain Charbit. 2019. «Pivotal Role of Mitochondria in Macrophage Response to Bacterial Pathogens». *Frontiers in Immunology* 10 (octobre): 2461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02461>.
- Reid, Angela B., Richard C. Kurten, Sandra S. McCullough, Robert W. Brock, et Jack A. Hinson. 2005. «Mechanisms of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Permeability Transition in Freshly Isolated Mouse Hepatocytes». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 312 (2): 509-16. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.075945>.
- Reinhart, Konrad, Ron Daniels, Niranjana Kissoon, James O'Brien, Flavia R. Machado, et Edgar Jimenez. 2013. «The Burden of Sepsis—a Call to Action in Support of World Sepsis Day 2013». *Journal of Critical Care* 28 (4): 526-28. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.04.012>.
- Remmerie, Anneleen, et Charlotte L. Scott. 2018. «Macrophages and lipid metabolism». *Cellular Immunology* 330 (août): 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.020>.
- Ricote, Mercedes, Andrew C Li, Timothy M Willson, Carolyn J Kelly, et Christopher K Glass. 1998. «The Peroxisome Proliferator- Activated Receptor- $\alpha$  Is a Negative Regulator of Macrophage Activation» 391: 4.
- Rizzuto, Rosario, Diego De Stefani, Anna Raffaello, et Cristina Mammucari. 2012. «Mitochondria as Sensors and Regulators of Calcium Signalling». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (9): 566-78. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>.
- Romani, Luigina. s. d. «Immunity to Candida Albicans: Th1, Th2 Cells and Beyond», 5.
- Rosa, Di, et S Moncada. 1990. «THE INDUCTION IN MACROPHAGES». *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 172 (3): 7.
- Rubic, Tina, Günther Lametschwandner, Sandra Jost, Sonja Hinteregger, Julia Kund, Nicole Carballido-Perrig, Christoph Schwärzler, et al. 2008. «Triggering the Succinate Receptor GPR91 on Dendritic Cells Enhances Immunity». *Nature Immunology* 9 (11): 1261-69. <https://doi.org/10.1038/ni.1657>.
- Ryan, Dylan Gerard, et Luke A. J. O'Neill. 2017. «Krebs Cycle Rewired for Macrophage and Dendritic Cell Effector Functions». *FEBS Letters* 591 (19): 2992-3006. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12744>.
- Saftig, Paul, et Judith Klumperman. 2009. «Lysosome Biogenesis and Lysosomal Membrane Proteins: Trafficking Meets Function». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (9): 623-35. <https://doi.org/10.1038/nrm2745>.
- Sahin, Emine, Stefan Haubenwallner, Mario Kuttke, Isabella Kollmann, Angela Halfmann, Alexander B. Dohnal, Li Chen, et al. 2014. «Macrophage PTEN Regulates Expression and Secretion of Arginase I Modulating Innate and Adaptive Immune Responses». *The Journal of Immunology* 193 (4):

- 1717-27.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302167>
- Sancak, Yasemin, Liron Bar-Peled, Roberto Zoncu, Andrew L. Markhard, Shigeyuki Nada, et David M. Sabatini. 2010. « Ragulator-Rag Complex Targets MTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids ». *Cell* 141 (2): 290-303.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.024>.
- Sapojnikova, Nelly, Joseph Maman, Fiona A. Myers, Alan W. Thorne, Vladimir I. Vorobyev, et Colyn Crane-Robinson. 2005. « Biochemical Observation of the Rapid Mobility of Nuclear HMGB1 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1729 (1): 57-63.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.03.002>.
- Sárkány, Zsuzsa, Teemu P. Ikonen, Frederico Ferreira-da-Silva, Maria João Saraiva, Dmitri Svergun, et Ana Margarida Damas. 2011. « Solution Structure of the Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (SRAGE)\* ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (43): 37525-34.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223438>.
- Satoh, Takashi, Osamu Takeuchi, Alexis Vandenberg, Koubun Yasuda, Yoshiaki Tanaka, Yutaro Kumagai, Tohru Miyake, et al. 2010. « The Jmjd3-Irf4 Axis Regulates M2 Macrophage Polarization and Host Responses against Helminth Infection ». *Nature Immunology* 11 (10): 936-44.  
<https://doi.org/10.1038/ni.1920>.
- Savina, Ariel, et Sebastian Amigorena. 2007. « Phagocytosis and Antigen Presentation in Dendritic Cells ». *Immunological Reviews* 219 (1): 143-56.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00552.x>.
- Scaffidi, Paola, Tom Misteli, et Marco E. Bianchi. 2002. « Release of Chromatin Protein HMGB1 by Necrotic Cells Triggers Inflammation ». *Nature* 418 (6894): 191-95.  
<https://doi.org/10.1038/nature00858>.
- Schaper, Fleur, Karina de Leeuw, Gerda Horst, Hendrika Bootsma, Pieter C. Limburg, Peter Heeringa, Marc Bijl, et Johanna Westra. 2016. « High Mobility Group Box 1 Skews Macrophage Polarization and Negatively Influences Phagocytosis of Apoptotic Cells ». *Rheumatology* 55 (12): 2260-70.  
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew324>.
- Scott, Charlotte L., Fang Zheng, Patrick De Baetselier, Liesbet Martens, Yvan Saeys, Sofie De Prijck, Saskia Lippens, et al. 2016. « Bone Marrow-Derived Monocytes Give Rise to Self-Renewing and Fully Differentiated Kupffer Cells ». *Nature Communications* 7 (1): 10321.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms10321>.
- Seidman, Jason S., Ty D. Troutman, Mashito Sakai, Anita Gola, Nathanael J. Spann, Hunter Bennett, Cassi M. Bruni, et al. 2020. « Niche-Specific Reprogramming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Immunity* 52 (6): 1057-1074.e7.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.001>.
- Seifert, Ashley W., James R. Monaghan, S. Randal Voss, et Malcolm Maden. 2012. « Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates ». Édité par Zhongjun Zhou. *PLoS ONE* 7 (4): e32875.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032875>.
- Semba, Hiroaki, Norihiko Takeda, Takayuki Isagawa, Yuki Sugiura, Kurara Honda, Masaki Wake, Hidenobu Miyazawa, et al. 2016. « HIF-1 $\alpha$ -PDK1 Axis-Induced Active Glycolysis Plays an Essential Role in Macrophage Migratory Capacity ». *Nature Communications* 7 (1): 11635.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms11635>.
- Serhan, Charles N, Nan Chiang, et Thomas E Van Dyke. 2009. « Resolving Inflammation: Dual Anti-Inflammatory and pro-Resolution Lipid Mediators », 31.
- Settembre, Carmine, Francesco Vetrini, Serkan Erdin, Serpil Uckac Erdin, Tuong Huynh, Diego Medina, Pasqualina Colella, Marco Sardiello, David C Rubinsztein, et Andrea Ballabio. 2011. « TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis » 332: 6.
- Shankar-Hari, Manu, Gary S. Phillips, Mitchell L. Levy, Christopher W. Seymour, Vincent X. Liu, Clifford S. Deutschman, Derek C. Angus, Gordon D. Rubenfeld, Mervyn Singer, et for the Sepsis Definitions Task Force. 2016. « Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) ». *JAMA* 315 (8): 775.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2016.0289>.
- Sharma, J. N., A. Al-Omran, et S. S. Parvathy. 2007. « Role of Nitric Oxide in Inflammatory Diseases ». *Inflammopharmacology* 15 (6):

- 252-59. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>.
- Shimizu, Toshiaki, Munekazu Yamakuchi, Kamal Krishna Biswas, Bibek Aryal, Shingo Yamada, Teruto Hashiguchi, et Ikuro Maruyama. 2016. « HMGB1 Is Secreted by 3T3-L1 Adipocytes through JNK Signaling and the Secretion Is Partially Inhibited by Adiponectin ». *Obesity* 24 (9): 1913-21. <https://doi.org/10.1002/oby.21549>.
- Shindo, Yuichiro, Jacqueline Unsinger, Cary-Ann Burnham, Jonathan M. Green, et Richard S. Hotchkiss. 2015. « Interleukin-7 and Anti-Programmed Cell Death 1 Antibody Have Differing Effects to Reverse Sepsis-Induced Immunosuppression ». *Shock (Augusta, Ga.)* 43 (4): 334-43. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000317>.
- Si, Kanno, Tomizawa A, Yomogida S, et Hara A. 2017. « Glutathione Peroxidase 3 Is a Protective Factor against Acetaminophen-induced Hepatotoxicity in Vivo and in Vitro ». *International Journal of Molecular Medicine*. Int J Mol Med. septembre 2017. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3049>.
- Sies, Helmut, Victor S. Sharov, Lars-Oliver Klotz, et Karlis Briviba. 1997. « Glutathione Peroxidase Protects against Peroxynitrite-Mediated Oxidations A NEW FUNCTION FOR SELENOPROTEINS AS PEROXYNITRITE REDUCTASE ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (44): 27812-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.27812>.
- Singer, Benjamin D., et Navdeep S. Chandel. 2019. « Immunometabolism of Pro-Repair Cells ». *Journal of Clinical Investigation* 129 (7): 2597-2607. <https://doi.org/10.1172/JCI124613>.
- Soberanes, Saul, Alexander V. Misharin, Amit Jairaman, Luisa Morales-Nebreda, Alexandra C. McQuattie-Pimentel, Takugo Cho, Robert B. Hamanaka, et al. 2019. « Metformin Targets Mitochondrial Electron Transport to Reduce Air-Pollution-Induced Thrombosis ». *Cell Metabolism* 29 (2): 335-347.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.019>.
- Soehnlein, Oliver, et Lennart Lindbom. 2010. « Phagocyte Partnership during the Onset and Resolution of Inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 10 (6): 427-39. <https://doi.org/10.1038/nri2779>.
- Sofiadis, Konstantinos, Milos Nikolic, Yulia Kargapolova, Natasa Josipovic, Anne Zirkel, Antonis Papadakis, Ioanna Papadionysiou, et al. 2019. « HMGB1 Coordinates SASP-Related Chromatin Folding and RNA Homeostasis on the Path to Senescence ». Preprint. Genomics. <https://doi.org/10.1101/540146>.
- Stumbo, Ana Carolina, Erika Cortez, Carlos Alberto Rodrigues, Maria das Graças M. O. Henriques, Luís Cristóvão Porto, Helene S. Barbosa, et Laís Carvalho. 2008. « Mitochondrial Localization of Non-Histone Protein HMGB1 during Human Endothelial Cell-Toxoplasma Gondii Infection ». *Cell Biology International* 32 (2): 235-38. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2007.08.031>.
- Sun, Xiaofang, et Daolin Tang. 2014. « HMGB1-Dependent and -Independent Autophagy ». *Autophagy* 10 (10): 1873-76. <https://doi.org/10.4161/auto.32184>.
- Tadie, Jean-Marc, Hong-Beom Bae, Shaoning Jiang, Dae Won Park, Celeste P. Bell, Huan Yang, Jean-Francois Pittet, et al. 2013. « HMGB1 Promotes Neutrophil Extracellular Trap Formation through Interactions with Toll-like Receptor 4 ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 304 (5): L342-49. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00151.2012>.
- Takaoka, Akinori, Hideyuki Yanai, Seiji Kondo, Gordon Duncan, Hideo Negishi, Tatsuaki Mizutani, Shin-ichi Kano, et al. 2005. « Integral Role of IRF-5 in the Gene Induction Programme Activated by Toll-like Receptors ». *Nature* 434 (7030): 243-49. <https://doi.org/10.1038/nature03308>.
- Tamura, Tomohiko, Hideyuki Yanai, David Savitsky, et Tadatsugu Taniguchi. 2008. « The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis ». *Annual Review of Immunology* 26 (1): 535-84. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400>.
- Tan, Zheng, Na Xie, Huachun Cui, Douglas R. Moellering, Edward Abraham, Victor J. Thannickal, et Gang Liu. 2015a. « Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Participates in Macrophage Polarization via Regulating Glucose Metabolism ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (12): 6082-89. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402469>.
- . 2015b. « Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 Participates in Macrophage Polarization via Regulating Glucose Metabolism ». *The Journal of Immunology* 194 (12): 6082-89. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402469>.

- Tang, D., R. Kang, C.-W. Cheh, K. M. Livesey, X. Liang, N. E. Schapiro, R. Benschop, et al. 2010. « HMGB1 Release and Redox Regulates Autophagy and Apoptosis in Cancer Cells ». *Oncogene* 29 (38): 5299-5310. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.261>.
- Tang, Daolin, Rui Kang, Kristen M. Livesey, Guido Kroemer, Timothy R. Billiar, Bennett Van Houten, Herbert J. Zeh, et Michael T. Lotze. 2011. « HMGB1 [High Mobility Group Box 1] is Essential for Mitochondrial Quality Control ». *Cell Metabolism* 13 (6): 701-11. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.04.008>.
- Tang, Yiting, Xin Zhao, Daniel Antoine, Xianzhong Xiao, Haichao Wang, Ulf Andersson, Timothy R. Billiar, Kevin J. Tracey, et Ben Lu. 2016. « Regulation of Posttranslational Modifications of HMGB1 During Immune Responses ». *Antioxidants & Redox Signaling* 24 (12): 620-34. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6409>.
- Tannahill, G. M., A. M. Curtis, J. Adamik, E. M. Palsson-McDermott, A. F. McGettrick, G. Goel, C. Frezza, et al. 2013. « Succinate Is an Inflammatory Signal That Induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$  ». *Nature* 496 (7444): 238-42. <https://doi.org/10.1038/nature11986>.
- Tattoli, I., D. J. Philpott, et S. E. Girardin. 2012. « The Bacterial and Cellular Determinants Controlling the Recruitment of MTOR to the Salmonella-Containing Vacuole ». *Biology Open* 1 (12): 1215-25. <https://doi.org/10.1242/bio.20122840>.
- Tedesco, Scattolini, Albiero, Bortolozzi, Avogaro, Cignarella, et Fadini. 2019. « Mitochondrial Calcium Uptake Is Instrumental to Alternative Macrophage Polarization and Phagocytic Activity ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (19): 4966. <https://doi.org/10.3390/ijms20194966>.
- Thomas, David G., Amanda C. Doran, Panagiotis Fotakis, Marit Westerterp, Per Antonson, Hui Jiang, Xian-Cheng Jiang, Jan-Åke Gustafsson, Ira Tabas, et Alan R. Tall. 2018. « LXR Suppresses Inflammatory Gene Expression and Neutrophil Migration through Cis-Repression and Cholesterol Efflux ». *Cell Reports* 25 (13): 3774-3785.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.100>.
- Thomas, J. O., et A. A. Travers. 2001. « HMG1 and 2, and Related "architectural" DNA-Binding Proteins ». *Trends in Biochemical Sciences* 26 (3): 167-74.
- Thomas, Lea, Zhigang Rao, Jana Gerstmeier, Martin Raasch, Christina Weinigel, Silke Rummeler, Dirk Menche, et al. 2017. « Selective Upregulation of TNF $\alpha$  Expression in Classically-Activated Human Monocyte-Derived Macrophages (M1) through Pharmacological Interference with V-ATPase ». *Biochemical Pharmacology* 130 (avril): 71-82. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.004>.
- Thorp, Edward B. s. d. « Mertk Receptor Mutation Reduces Efferocytosis Efficiency and Promotes Apoptotic Cell Accumulation and Plaque Necrosis in Atherosclerotic Lesions of Apoe $^{-/-}$  Mice ». Consulté le 9 décembre 2020. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.167197>.
- Tian, Jane, Ana Maria Avalos, Su-Yau Mao, Bo Chen, Kannaki Senthil, Herren Wu, Peggy Parroche, et al. 2007. « Toll-like Receptor 9-Dependent Activation by DNA-Containing Immune Complexes Is Mediated by HMGB1 and RAGE ». *Nature Immunology* 8 (5): 487-96. <https://doi.org/10.1038/ni1457>.
- Tian, Xiao Yu, Kirthana Ganeshan, Cynthia Hong, Khoa D. Nguyen, Yifu Qiu, Jason Kim, Rajendra K. Tangirala, Peter Tontonoz, et Ajay Chawla. 2016. « Thermoneutral Housing Accelerates Metabolic Inflammation to Potentiate Atherosclerosis but Not Insulin Resistance ». *Cell Metabolism* 23 (1): 165-78. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.003>.
- Tinsley, Kevin W., Mitchell H. Grayson, Paul E. Swanson, Anne M. Drewry, Katherine C. Chang, Irene E. Karl, et Richard S. Hotchkiss. 2003. « Hotchkiss ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (2): 909-14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.909>.
- Tisoncik, Jennifer R., Marcus J. Korth, Cameron P. Simmons, Jeremy Farrar, Thomas R. Martin, et Michael G. Katze. 2012. « Into the Eye of the Cytokine Storm ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (1): 16-32. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05015-11>.
- Torgersen, Christian, Patrizia Moser, Günter Luckner, Viktoria Mayr, Stefan Jochberger, Walter R. Hasibeder, et Martin W. Dünser. 2009. « Macroscopic Postmortem Findings in 235 Surgical Intensive Care Patients with Sepsis ». *Anesthesia and Analgesia* 108 (6): 1841-47. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e318195e11d>.

- Triantafyllou, Evangelos, Oltin T Pop, Lucia A Possamai, Annika Wilhelm, Evaggelia Liaskou, Arjuna Singanayagam, Christine Bernsmeier, et al. 2018. « MerTK Expressing Hepatic Macrophages Promote the Resolution of Inflammation in Acute Liver Failure ». *Gut* 67 (2): 333-47. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313615>.
- Trifunovic, Aleksandra, Anna Wredenberg, Maria Falkenberg, Johannes N. Spelbrink, Anja T. Rovio, Carl E. Bruder, Mohammad Bohlooly-Y, et al. 2004. « Premature Ageing in Mice Expressing Defective Mitochondrial DNA Polymerase ». *Nature* 429 (6990): 417-23. <https://doi.org/10.1038/nature02517>.
- Tschopp, Jurg, et Kate Schroder. 2010. « NLRP3 Inflammasome Activation: The Convergence of Multiple Signalling Pathways on ROS Production? ». *Nature Reviews Immunology* 10 (3): 210-15. <https://doi.org/10.1038/nri2725>.
- Tugal, Derin, Xudong Liao, et Mukesh K. Jain. 2013. « Transcriptional Control of Macrophage Polarization ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (6): 1135-44. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301453>.
- Vago, Juliana P., Izabela Galvão, Grazielle L. Negreiros-Lima, Livia C.R. Teixeira, Kátia M. Lima, Michelle A. Sugimoto, Isabella Z. Moreira, et al. 2020. « Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Modulates Macrophage Polarization and Apoptotic Cell Clearance ». *Pharmacological Research* 158 (août): 104842. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104842>.
- Van den Bossche, Jan, Jeroen Baardman, Natasja A. Otto, Saskia van der Velden, Annette E. Neele, Susan M. van den Berg, Rosario Luque-Martin, et al. 2016. « Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages ». *Cell Reports* 17 (3): 684-96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.008>.
- van Riet, Sander, Annemarie van Schadewijk, Steve de Vos, Nick Vandeghinste, Robbert J. Rottier, Jan Stolk, Pieter S. Hiemstra, et Padmini Khedoe. 2020. « Modulation of Airway Epithelial Innate Immunity and Wound Repair by M(GM-CSF) and M(M-CSF) Macrophages ». *Journal of Innate Immunity* 12 (5): 410-21. <https://doi.org/10.1159/000506833>.
- Vats, Divya, Lata Mukundan, Justin I. Odegaard, Lina Zhang, Kristi L. Smith, Christine R. Morel, David R. Greaves, Peter J. Murray, et Ajay Chawla. 2006. « Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation ». *Cell metabolism* 4 (1): 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.011>.
- Venereau, Emilie, Maura Casalgrandi, Milena Schiraldi, Daniel J. Antoine, Angela Cattaneo, Francesco De Marchis, Jaron Liu, et al. 2012. « Mutually Exclusive Redox Forms of HMGB1 Promote Cell Recruitment or Proinflammatory Cytokine Release ». *Journal of Experimental Medicine* 209 (9): 1519-28. <https://doi.org/10.1084/jem.20120189>.
- Viaud, Manon, Stoyan Ivanov, Nemanja Vujic, Madalina Duta-Mare, Lazaro-Emilio Aira, Thibault Barouillet, Elsa Garcia, et al. 2019. « Lysosomal Cholesterol Hydrolysis Couples Efferocytosis to Anti-Inflammatory Oxysterol Production », 30.
- Vincent, Jean-Louis, et Edward Abraham. 2006. « The Last 100 Years of Sepsis ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173 (3): 256-63. <https://doi.org/10.1164/rccm.200510-1604OE>.
- Viola, Antonella, Fabio Munari, Ricardo Sánchez-Rodríguez, Tommaso Scolaro, et Alessandra Castegna. 2019. « The Metabolic Signature of Macrophage Responses ». *Frontiers in Immunology* 10 (juillet): 1462. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>.
- Visvikis, Orane, Nnamdi Ihuegbu, Sid A. Laped, Lyly G. Luhachack, Anna-Maria F. Alves, Amanda C. Wollenberg, Lynda M. Stuart, Gary D. Stormo, et Javier E. Irazoqui. 2014. « Innate Host Defense Requires TFEB-Mediated Transcription of Cytoprotective and Antimicrobial Genes ». *Immunity* 40 (6): 896-909. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.002>.
- Vogel, Lauren. 2017. « Sepsis Kills One Million Newborns a Year: WHO ». *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Médicale Canadienne* 189 (40): E1272. <https://doi.org/10.1503/cmaj.109-5504>.
- Wang, Dengli, Keyue Liu, Yusuke Fukuyasu, Kiyoshi Teshigawara, Li Fu, Hidenori Wake, Aiji Ohtsuka, et Masahiro Nishibori. 2020. « HMGB1 Translocation in Neurons after Ischemic Insult: Subcellular Localization in Mitochondria and Peroxisomes ». *Cells* 9 (3): 643. <https://doi.org/10.3390/cells9030643>.



- Wang, Ping, Jing Geng, Jiahui Gao, Hao Zhao, Junhong Li, Yiran Shi, Bingying Yang, et al. 2019. « Macrophage Achieves Self-Protection against Oxidative Stress-Induced Ageing through the Mst-Nrf2 Axis ». *Nature Communications* 10 (1): 755. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08680-6>.
- Wang, Yuhui, Yaqi Ouyang, Baoyan Liu, Xiaochun Ma, et Renyu Ding. 2018. « Platelet Activation and Antiplatelet Therapy in Sepsis: A Narrative Review ». *Thrombosis Research* 166: 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.04.007>.
- Watson, M., K. Stott, H. Fischl, L. Cato, et J. O. Thomas. 2014. « Characterization of the Interaction between HMGB1 and H3--a Possible Means of Positioning HMGB1 in Chromatin ». *Nucleic Acids Research* 42 (2): 848-59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt950>.
- Wei, Xiaochao, Haowei Song, Li Yin, Michael G. Rizzo, Rohini Sidhu, Douglas F. Covey, Daniel S. Ory, et Clay F. Semenkovich. 2016. « Fatty Acid Synthesis Configures the Plasma Membrane for Inflammation in Diabetes ». *Nature* 539 (7628): 294-98. <https://doi.org/10.1038/nature20117>.
- Weichhart, Thomas, Markus Hengstschläger, et Monika Linke. 2015. « Regulation of Innate Immune Cell Function by MTOR ». *Nature Reviews Immunology* 15 (10): 599-614. <https://doi.org/10.1038/nri3901>.
- Weis, M., G. E. Kass, S. Orrenius, et P. Moldéus. 1992. « N-Acetyl-p-Benzoquinone Imine Induces Ca<sup>2+</sup> Release from Mitochondria by Stimulating Pyridine Nucleotide Hydrolysis ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (2): 804-9.
- Weiskirchen, Ralf, Sabine Weiskirchen, et Frank Tacke. 2018. « Organ and Tissue Fibrosis: Molecular Signals, Cellular Mechanisms and Translational Implications ». *Molecular Aspects of Medicine*, juin. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.06.003>.
- West, A. Phillip, Igor E. Brodsky, Christoph Rahner, Dong Kyun Woo, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Matthew C. Walsh, Yongwon Choi, Gerald S. Shadel, et Sankar Ghosh. 2011. « TLR Signalling Augments Macrophage Bactericidal Activity through Mitochondrial ROS ». *Nature* 472 (7344): 476-80. <https://doi.org/10.1038/nature09973>.
- Westman, Johannes, Glenn F.W. Walpole, Lydia Kasper, Bessie Y. Xue, Osama Elshafee, Bernhard Hube, et Sergio Grinstein. 2020. « Lysosome Fusion Maintains Phagosome Integrity during Fungal Infection ». *Cell Host & Microbe*, octobre, S1931312820305059. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.09.004>.
- Williams, C. David, Mary Lynn Bajt, Matthew R. Sharpe, Mitchell R. McGill, Anwar Farhood, et Hartmut Jaeschke. 2014. « Neutrophil Activation during Acetaminophen Hepatotoxicity and Repair in Mice and Humans ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 275 (2): 122-33. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.01.004>.
- Williams, C. David, Anwar Farhood, et Hartmut Jaeschke. 2010. « Role of Caspase-1 and Interleukin-1 $\beta$  in Acetaminophen-Induced Hepatic Inflammation and Liver Injury ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 247 (3): 169-78. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.004>.
- Williams, Niamh C., et Luke A. J. O'Neill. 2018. « A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 9 (février): 141. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00141>.
- Wolf, Dane M, Mayuko Segawa, Arun Kumar Kondadi, Ruchika Anand, Sean T Bailey, Andreas S Reichert, Alexander M van der Blik, David B Shackelford, Marc Liesa, et Orian S Shirihai. 2019. « Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent ». *The EMBO Journal* 38 (22). <https://doi.org/10.15252/emboj.2018101056>.
- Wu, Jing-Yiing, Tsai-Wang Huang, Yi-Ting Hsieh, Yi-Fu Wang, Chia-Chien Yen, Guan-Lin Lee, Chang-Ching Yeh, et al. 2020. « Cancer-Derived Succinate Promotes Macrophage Polarization and Cancer Metastasis via Succinate Receptor ». *Molecular Cell* 77 (2): 213-227.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.023>.
- Wyant, Gregory A., Monther Abu-Remaileh, Rachel L. Wolfson, Walter W. Chen, Elizaveta Freinkman, Laura V. Danai, Matthew G. Vander Heiden, et David M. Sabatini. 2017. « MTORC1 Activator SLC38A9 Is Required to Efflux Essential Amino Acids from Lysosomes and Use Protein as a Nutrient ». *Cell* 171 (3): 642-654.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.046>.
- Xia, Yu, Na Liu, Xiuxiu Xie, Guoyu Bi, Hongping Ba, Lin Li, Jinxia Zhang, et al. 2019. « The macrophage-specific V-ATPase subunit ATP6V0D2 restricts inflammasome

- activation and bacterial infection by facilitating autophagosome-lysosome fusion ». *Autophagy* 15 (6): 960-75. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1569916>.
- Xue, Jia, Susanne V. Schmidt, Jil Sander, Astrid Draffehn, Wolfgang Krebs, Inga Quester, Dominic De Nardo, et al. 2014. « Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation ». *Immunity* 40 (2): 274-88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.006>.
- Yan, Jiawei, et Tiffany Horng. 2020. « Lipid Metabolism in Regulation of Macrophage Functions ». *Trends in Cell Biology* 30 (12): 979-89. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.09.006>.
- Yanai, Hideyuki, Atsushi Matsuda, Jianbo An, Ryuji Koshiba, Junko Nishio, Hideo Negishi, Hiroaki Ikushima, et al. 2013. « Conditional Ablation of HMGB1 in Mice Reveals Its Protective Function against Endotoxemia and Bacterial Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51): 20699-704. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320808110>.
- Yang, De, Zhen Han, et Joost J. Oppenheim. 2017. « ALARMINS AND IMMUNITY ». *Immunological reviews* 280 (1): 41-56. <https://doi.org/10.1111/imr.12577>.
- Yang, Huan, et Kevin J. Tracey. 2010. « Targeting HMGB1 in Inflammation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1799 (1-2): 149-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.11.019>.
- Yang, Liangchun, Min Xie, Minghua Yang, Yan Yu, Shan Zhu, Wen Hou, Rui Kang, et al. 2014. « PKM2 Regulates the Warburg Effect and Promotes HMGB1 Release in Sepsis ». *Nature Communications* 5 (1): 4436. <https://doi.org/10.1038/ncomms5436>.
- Yao, GuanFeng, HaoTian Feng, YanLing Cai, WeiLi Qi, et KangMei Kong. 2007. « Characterization of Vacuolar-ATPase and Selective Inhibition of Vacuolar-H(+)-ATPase in Osteoclasts ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357 (4): 821-27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.082>.
- Youn, Ju Ho, et Jeon-Soo Shin. 2006. « Nucleocytoplasmic Shuttling of HMGB1 Is Regulated by Phosphorylation That Redirects It toward Secretion ». *The Journal of Immunology* 177 (11): 7889-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.7889>.
- Yu, Shan, Sijia Li, Adam Henke, Evan D. Muse, Bo Cheng, Gustav Welzel, Arnab K. Chatterjee, et al. 2016. « Dissociated Sterol-based Liver X Receptor Agonists as Therapeutics for Chronic Inflammatory Diseases ». *The FASEB Journal* 30 (7): 2570-79. <https://doi.org/10.1096/fj.201600244R>.
- Yuan, Liyun, et Neil Kaplowitz. 2013. « Mechanisms of Drug Induced Liver Injury ». *Clinics in liver disease* 17 (4): 507-18. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.07.002>.
- Yvan-Charvet, Laurent, et Stoyan Ivanov. s.d. « Metabolic Reprogramming of Macrophages in Atherosclerosis: Is It All about Cholesterol? », 12.
- Zajd, Cheryl M., Alexis M. Ziemba, Grace M. Miralles, Terry Nguyen, Paul J. Feustel, Stanley M. Dunn, Ryan J. Gilbert, et Michelle R. Lennartz. 2020. « Bone Marrow-Derived and Elicited Peritoneal Macrophages Are Not Created Equal: The Questions Asked Dictate the Cell Type Used ». *Frontiers in Immunology* 11 (février): 269. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00269>.
- Zamora, Ruben, Derek Barclay, Jinling Yin, Estella M. Alonso, Mike A. Leonis, Qi Mi, Timothy R. Billiar, Richard L. Simmons, Robert H. Squires, et Yoram Vodovotz. 2019. « HMGB1 Is a Central Driver of Dynamic Pro-Inflammatory Networks in Pediatric Acute Liver Failure Induced by Acetaminophen ». *Scientific Reports* 9 (1): 5971. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42564-5>.
- Zettel, Kent R., Mitchell Dyer, Jay S. Raval, Xubo Wu, John R. Klune, Andres Gutierrez, Darrell J. Triulzi, Timothy R. Billiar, et Matthew D. Neal. 2017. « Aged Human Stored Red Blood Cell Supernatant Inhibits Macrophage Phagocytosis in an HMGB1 Dependent Manner After Trauma in a Murine Model ». *Shock* 47 (2): 217-24. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000716>.
- Zhang, Chao, Jin Feng, Jun Du, Zhiyong Zhuo, Shuo Yang, Weihong Zhang, Weihong Wang, et al. 2018. « Macrophage-Derived IL-1 $\alpha$  Promotes Sterile Inflammation in a Mouse Model of Acetaminophen Hepatotoxicity ». *Cellular & Molecular Immunology* 15 (11): 973-82. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.22>.
- Zhang, Jing, Lei Zhang, Shu Zhang, Qilin Yu, Fei Xiong, Kun Huang, Cong-Yi Wang, et Ping Yang. 2017. « HMGB1, an Innate Alarmin, Plays a Critical Role in Chronic

- Inflammation of Adipose Tissue in Obesity ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 454 (octobre): 103-11. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.012>.
- Zhang, Shuang, Samuel Weinberg, Matthew DeBerge, Anastasiia Gainullina, Matthew Schipma, Jason M. Kinchen, Issam Ben-Sahra, et al. 2019. « Efferocytosis Fuels Requirements of Fatty Acid Oxidation and the Electron Transport Chain to Polarize Macrophages for Tissue Repair ». *Cell Metabolism* 29 (2): 443-456.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.004>.
- Zhang, Weili, Kory J. Lavine, Slava Epelman, Sarah A. Evans, Carla J. Weinheimer, Philip M. Barger, et Douglas L. Mann. 2015. « Necrotic Myocardial Cells Release Damage-Associated Molecular Patterns That Provoke Fibroblast Activation In Vitro and Trigger Myocardial Inflammation and Fibrosis In Vivo ». *Journal of the American Heart Association* 4 (6). <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.001993>.
- Zheng, C, Q Yang, J Cao, N Xie, K Liu, P Shou, F Qian, Y Wang, et Y Shi. 2016. « Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity ». *Cell Death & Disease* 7 (3): e2167. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.54>.
- Zhou, Xueyuan, Wenxiu Yang, et Junying Li. 2006. « Ca<sup>2+</sup> - and Protein Kinase C-Dependent Signaling Pathway for Nuclear Factor-KB Activation, Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression, and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Peritoneal Macrophages ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (42): 31337-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602739200>.
- Zhou, Yi, Mingjian Fei, Gu Zhang, Wei-Ching Liang, WeiYu Lin, Yan Wu, Robert Piskol, et al. 2020. « Blockade of the Phagocytic Receptor MerTK on Tumor-Associated Macrophages Enhances P2X7R-Dependent STING Activation by Tumor-Derived CGAMP ». *Immunity* 52 (2): 357-373.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.01.014>.
- Zhu, Xiaorong, Jeannette S. Messer, Yunwei Wang, Fanfei Lin, Candace M. Cham, Jonathan Chang, Timothy R. Billiar, Michael T. Lotze, David L. Boone, et Eugene B. Chang. 2015. « Cytosolic HMGB1 Controls the Cellular Autophagy/Apoptosis Checkpoint during Inflammation ». *Journal of Clinical Investigation* 125 (3): 1098-1110. <https://doi.org/10.1172/JCI76344>.
- Zigmond, Ehud, Shany Samia-Grinberg, Metsada Pasmanik-Chor, Eli Brazowski, Oren Shibolet, Zamir Halpern, et Chen Varol. 2014. « Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury ». *The Journal of Immunology* 193 (1): 344-53. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400574>.
- Zindel, Joel, et Paul Kubers. 2020. « DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 15 (1): 493-518. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>.
- Zizzo, Gaetano, Brendan A. Hilliard, Marc Monestier, et Philip L. Cohen. 2012. « Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction ». *The Journal of Immunology* 189 (7): 3508-20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200662>.
- Zoncu, Roberto, Liron Bar-Peled, Alejo Efeyan, Shuyu Wang, Yasemin Sancak, et David M Sabatini. 2011. « mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase » 334: 7.
- Zuk, Patricia A, Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A De Ugarte, Jerry I Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C Alfonso, John K Fraser, Prosper Benhaim, et Marc H Hedrick. 2002. « Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells » 13: 17.