



Impact de l'acétoacétate sur la biologie des macrophages humains : analyse phénotypique et métabolique

Clément Adam

► To cite this version:

Clément Adam. Impact de l'acétoacétate sur la biologie des macrophages humains : analyse phénotypique et métabolique. Immunologie. Université d'Angers, 2019. Français. NNT : 2019ANGE0049 . tel-03510290

HAL Id: tel-03510290

<https://theses.hal.science/tel-03510290>

Submitted on 4 Jan 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Immunologie

Par

Clément ADAM

**Impact de l'acétoacétate sur la biologie des macrophages humains :
analyse phénotypique et métabolique**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 18 décembre 2019
Unité de recherche : U1232 Equipe Immunité Innée et Immunothérapie
Thèse N° : 139398

Rapporteurs avant soutenance : Composition du Jury :

Franck Morel PU, LITEC EA 4331, Poitiers
Johan Garaude CRCN, INSERM U1211, Bordeaux

Valérie GOUILLEUX-GRUART MCU-PH, GICC Eq FRAME, Tours
Naïg Guegen Ingénieur, UMR CNRS 6015 INSERM U1083, Angers
Alain Morel PU, CRCINA, INSERM U1232, Angers

Directeur de thèse
Pascale Jeannin PU-PH, CRCINA, INSERM U1232, Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

REMERCIEMENTS

Remerciements

Je tiens à remercier vivement les membres du jury, professeur Franck Morel, docteur Johan Garaude, professeur Alain Morel, docteur Naïg Gueguen, et docteur Valérie Gouilleux-Gruart pour l'évaluation de mon travail et leur participation à mon jury de thèse.

Je remercie docteur Dorothée Duluc et professeur Procaccio pour leur participation aux comités de suivi de thèse.

Je remercie tout particulièrement professeur Pascale Jeannin pour m'avoir donné l'envie de faire cette thèse et de l'avoir encadrée au travers de sa persévérance, son énergie sans limite et communicatrice y compris dans les moments difficiles, et sa disponibilité pendant ces 4 ans de doctorat.

Je remercie docteur Yves Delneste pour sa disponibilité, sa perspicacité et d'avoir consacré beaucoup de temps à relire et corriger maintes fois ce manuscrit.

Je remercie également professeur Dominique Couez pour la relecture de ce manuscrit.

Au cours de cette thèse et de ces projets, j'ai pu approfondir considérablement mes connaissances dans le domaine du métabolisme et tout ce que ce nom implique dans la biologie cellulaire. Aussi j'aimerais remercier professeur Procaccio et son équipe pour leur patience et leur pédagogie afin de nous familiariser avec la théorie et la pratique pour comprendre ce vaste domaine et répondre à nos nombreuses questions pour mener à bien nos projets.

Jamais ce travail n'aurait été possible sans de nombreuses personnes qui ont apporté leurs qualités, leur savoir-faire, leurs connaissances et dont leur participation fut essentielle à l'aboutissement de ce travail. Je remercie donc Léa, Laurence, Simon, Pascale, Céline, docteur Yves Delneste et professeur Pascale Jeannin.

Je remercie chaleureusement Léa pour ces nombreuses années à travailler ensemble, sa motivation, son énergie, son soutien et nos vives discussions scientifiques !

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe Immunité Innée et Immunothérapie, pour leur accueil, leur bonne humeur et leur collaboration au quotidien.

Je remercie également Catherine Guillet et Jérôme Cayon, pour leur judicieux conseils et leur disponibilité.

Enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements aux miens, pour leur présence, leur écoute et leur soutien. Merci !

1. Abréviations	7
2. Avant-propos	11
3. Introduction	13
a. Généralités sur le système immunitaire	13
1. Les acteurs cellulaires	15
a. Les cellules myéloïdes	15
b. Les cellules d'origine lymphoïde	17
i. Les cellules de l'immunité innée d'origine lymphoïde	17
ii. Les cellules de l'immunité adaptative d'origine lymphoïde	18
2. Les acteurs moléculaires	20
b. Biologie des macrophages	24
i. Origine(s)	24
1. Ontogénie des macrophages	24
2. Facteurs de survie et de différenciation	26
ii. Diversités phénotypiques et rôles physiologiques des macrophages	28
1. Rôles physiologiques des macrophages	28
a. Phagocytose	29
b. Activité inflammatoire	30
c. Résolution de l'inflammation	30
d. Réparation tissulaire et cicatrisation	31
e. Rôles spécifiques des macrophages tissulaires	32
2. Dichotomie M1-M2	34
a. Les macrophages de type M1	35
b. Les macrophages de type M2	37
c. Différences Homme – Souris sur la biologie des macrophages	38
iii. Rôles pathologiques des macrophages	42
1. Cancer	42
2. Maladies Inflammatoires chroniques	44
a. L'asthme	44
b. L'athérosclérose	45
c. La polyarthrite rhumatoïde	45
3. Ciblage thérapeutique des macrophages	46
c. Les corps cétoniques	47
i. Généralités	47
ii. Synthèse et rôles des corps cétoniques	48
1. Définition/synthèse	48
2. Rôles des corps cétoniques	50
a. Métabolite / substrat énergétique	50
b. Molécule de signalisation	51
i. Fonctions de signalisation directes	52
1. Inhibition des Histones Désacétylases	52
2. β -Hydroxybutyrylation des protéines	53
3. Récepteurs au β -OHB	53
ii. Fonctions de signalisation indirectes	54
1. Augmentation du pool d'acétyl-CoA, substrat pour l'acétylation des protéines	54

2.	Synthèse de neurotransmetteur	55
iii.	Diète Cétogène	55
a.	Généralités/Définition	55
b.	Essais cliniques / applications	56
i.	Longévité et qualité de vie	56
ii.	La perte de poids	57
iii.	Les maladies cardiovasculaires	58
iv.	Diabète de type II.	58
v.	Epilepsie	59
vi.	Le cancer	59
4.	Contexte et objectifs	61
5.	Résultats	63
a.	Etude 1 : Impact du régime cétogène sur la cicatrisation et rôle de l'acétoacétate sur la génération de macrophages réparateurs	63
i.	Contexte et objectifs de l'étude	63
ii.	Résultats de l'étude	63
1.	L'acétoacétate induit l'expression de molécules impliquées dans les processus de réparation/cicatrisation par les macrophages humains	63
2.	L'acétoacétate induit l'expression de molécules impliquées dans la cicatrisation indépendamment de l'empreinte cytokinique	66
3.	L'acétoacétate augmente la respiration oxydative des macrophages humains	67
4.	L'acquisition d'un profil réparateur et cicatrisant est induite par l'acétoacétate, mais pas par le β -hydroxybutyrate	68
5.	Le régime cétogène et l'acétoacétate accélèrent la cicatrisation tissulaire	69
6.	Conclusion de l'étude	71
iii.	Figure supplémentaire et matériel et méthodes	71
1.	Figure supplémentaire	71
2.	Isolement monocyttaire et génération des cellules humaines	72
3.	Génération des macrophages murins	73
4.	Culture en corps cétoniques	73
5.	Quantification des cytokines	73
6.	Analyse de cytométrie en flux	73
7.	Test activité phagocytaire	74
8.	Analyse de l'expression des ARNm	74
9.	Mesure du taux de consommation d'oxygène (oxygen consumption rate, OCR)	74
10.	Quantification des taux sériques des corps cétoniques	75
11.	Modèle animal de cicatrisation	75
12.	Statistiques	75
b.	Etude 2 : L'acétoacétate protège les macrophages humains d'un état de pseudo-starvation induit par une acidose lactique	76
i.	Contexte et objectifs de l'étude	76
ii.	Résumé des résultats de l'étude	76
1.	Les macrophages humains en acidose lactique présentent une masse mitochondriale réduite	76
2.	L'expression des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale n'est pas modulée en acidose lactique	77
3.	L'acide lactique induit une dysfonction des mitochondries	78

4.	L'acidose lactique amplifie le flux autophagique _____	78
5.	L'autophagie est indispensable à la survie des macrophages humains en acidose lactique ____	79
6.	Les macrophages en acidose lactique présentent un changement métabolique et physique typique des cellules en famine _____	79
7.	L'acide lactique réduit drastiquement la capture de nutriments par les macrophages humains	80
8.	Un pH extracellulaire acide conduit à une acidification intracellulaire transitoire _____	80
9.	L'acétoacétate protège les macrophages humains de la mitochophagie et d'un état de pseudo-starvation induits par l'acidose lactique _____	81
10.	L'acétoacétate n'affecte pas le phénotype des macrophages exposés à l'acide lactique ____	81
11.	Conclusion de l'étude _____	82
iii.	Manuscrit (article soumis à la revue Nature Communicaton) _____	82
6.	Discussion et perspectives _____	129
a.	Rôle de l'acétoacétate sur les fonctions effectrices des macrophages, impact du régime cétoène sur la cicatrisation _____	129
i.	L'acétoacétate modifie le phénotype immunitaire des macrophages _____	129
ii.	Le profil phénotypique induit par l'acétoacétate est différent de celui des macrophages réparateurs prototypes. _____	130
iii.	Effet universel de l'acétoacétate sur les macrophages _____	130
iv.	Effets de l'acétoacétate sur la respiration oxydative cellulaire _____	131
v.	L'effet de l'acétoacétate n'est pas mimé par le β -hydroxybutyrate _____	132
vi.	Impact du régime cétoène et de l'acétoacétate sur la cicatrisation _____	132
vii.	Conclusion _____	133
viii.	Perspectives _____	133
b.	Rôle de l'acétoacétate sur le métabolisme des macrophages humains dans un contexte d'acidose lactique _____	136
i.	L'acidose lactique induit un état de pseudo-starvation _____	136
ii.	L'autophagie induite par l'acidose lactique permet la survie cellulaire _____	137
iii.	Les macrophages en acidose lactique présentent des dysfonctions mitochondriales qui sont prévenues par l'acétoacétate _____	137
iv.	Conclusion _____	138
v.	Perspectives _____	138
7.	Références bibliographiques _____	141
8.	Annexes _____	159
a.	Annexe 1: Lactic acidosis cooperates with GM-CSF and M-CSF to induce human macrophages with an inflammatory and pro-tumor phenotype, Paolini L, Adam C et al (article soumis à la revue Cancer Immunology Research) _____	159
b.	Annexe2 : The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophage, Jeannin P et al, revue publiée dans la revue FEBS Journal _____	162
	Table des illustrations _____	168
	Table des tableaux _____	170



1. Abréviations

AcAc	Acétoacétate
ACAT	Acétyl-CoA C-acétyltransférase
ACLY	ATP-citrate lyase
ADCC	Antibody-dependent cell cytotoxicity
ALR	AIM2-like receptors
ATP	Adénosine tri-phosphate
Arg1	Arginase 1
β -OHB	β -hydroxybutyrate
BCR	B cell receptor
BDH1	β -hydroxybutyrate déshydrogénase
C1q	complement component 1q
CCL	C-C motif chemokine ligand
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
CD	Cluster de différenciation
CL	Collectin
CLP	Cecal ligation puncture
CLR	C-type lectin receptors
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
cMOP	common monocyte progenitor
CoA	Coenzyme A
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CPT1	carnitine palmitoyltransferase 1
CR	Complement receptor
CRD	Carbohydrate recognition domain
CRP	C reactive protein
CSF-1	Colony-stimulating factor 1
CSFR	Colony-stimulating factor receptor
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CTLD	C-type lectin-like domain
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DC	Dendritic cells
E	Embryonnaire
EGF	Epidermal growth factor
EMP	Erythro-myeloid progenitors
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide
FcR	Fragment crystallizable receptor
FFAR3	Free fatty acid receptor 3
GABA	γ -aminobutyrique acide
GFP	Green fluorescent protein
GLUT	Glucose transporter
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMDP	Granulocyte, monocyte and dendritic cell progenitor
GPR	G-protein-coupled receptors
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HB-EGF	Heparin-binding EGF
HCAR2	Hydroxycarboxylic acid receptor 2

HDAC	Histones désacétylases de classe
HDL	High density lipoprotein
HIF	Hypoxia-induced Factor
HK	Hexokinase
HMG	hydroxymethylglutaryl
HMGCL	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase
HMGCS2	3-hydroxymethylglutaryl-CoA synthase
IC	Complexe immuns
IDH	Isocitrate dehydrogenase
IFN	Interferon
Ig	Immuboglobuline
IL	Interleukine
ILC3	Innate lymphoid cells de type 3
KIR	Killer immunoglobuline-like receptors
LDHA	Lactate deshydrogenase A
LB	Lymphocytes B
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocytes T
LXR	Liver X receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MBL	Mannose binding lectin
MCT	monocarboxylate transporter
MDP	monocyte and dendritic cell progenitor
MMP	Matrix metalloproteinase
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
Mrc1	Mannose receptor C-type 1
NAD	nicotinamide adénine dinucleotide
NETS	Neutrophils extracellular traps
NF-kB	Nuclear Factor kappaB
NO	Nitric oxide
NOS	NO synthase
NK	Natural Killer cells
NKT	Natural killer T cell
NLR	NOD-like receptors
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OSM	Oncostatin M
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PGC-1 β	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta
PGE ₂	Prostaglandine E2
pH	Potentiel hydrogène
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PRM	Pattern recognition molecule
PTP ζ	Protein tyrosine phosphatase, receptor type ζ
PTX3	Pentraxin 3

PRR	Pattern recognition receptor
RAG	Recombination activating gene
RANK-L	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RLR	RIG-I-like receptors
ROS	Reactive oxygen species
SAP	Serum amyloid P component
SCOT	succinyl-CoA-oxoacid transférase
SNC	Système nerveux central
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SP	Surfactant protein
SR	Scavenger receptors
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Tumor-associated macrophage
TEP	Tomographie par émission de positons
TCR	T cell receptor
Tfh	T follicular helper
TGF	Transforming growth Factor
TGM2	Transglutaminase 2
Th	T helper
TLR	Toll-Like Receptor
TNF α	Tumor necrosis factor α
Treg	Regulatory T cells
VEGF	Vascular endothelial growth factor

2. Avant-propos

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des effecteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la protection des organismes contre les dangers auxquels ils sont exposés. La survenue d'infections graves chez des patients présentant un déficit immunitaire a révélé l'importance du rôle du système immunitaire. En effet, longtemps réduit à la protection contre les microbes, il est maintenant acquis que le système immunitaire participe à l'homéostasie immunitaire, lui attribuant de nouvelles propriétés longtemps ignorées.

Les travaux de Polly Matzinger et Ruslan Medzhitov ont établi que l'immunité est un système complexe, interconnecté et spécialisé notamment dans la détection de dangers qu'ils soient d'origine exogène (comme les microbes) ou endogènes (comme les cellules mortes) (Matzinger, 2002; Medzhitov, 2001). La réponse immunitaire mise en place dépendra donc de la nature du signal de danger : tolérance vis-à-vis des cellules apoptotiques ou induction d'une réponse immunitaire face à un microbe. Des études ont également permis de démontrer que le système immunitaire présente des fonctions essentielles dans la réparation tissulaire permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire. Afin d'assurer ces différentes fonctions, le système immunitaire est en permanence finement régulé pour constamment adapter sa réponse aux besoins des tissus.

Malgré l'existence de nombreux points de contrôle mis en place pour réguler et contrôler la réponse immunitaire, l'homéostasie immunitaire peut être rompue et conduire à des désordres pathologiques sévères. Une réponse inadaptée ou excessive à la suite de la détection de signal endogène ou l'induction de tolérance contre un signal exogène provoquera, respectivement, des manifestations auto-immunes ou des infections sévères ou allergiques, délétères pour l'organisme. Dans d'autres pathologies sévères, les propriétés du système immunitaire seront détournées comme lors du développement tumoral.

L'équipe 7 du CRCINA, dans laquelle ces travaux de thèse ont été réalisés, est spécialisée dans l'analyse des propriétés et des fonctions du système immunitaire inné, et plus particulièrement dans la biologie des macrophages. Les travaux présentés dans ce manuscrit portent sur la plasticité des macrophages humains en présence de corps cétoniques, précisément l'acétoacétate, et les mécanismes sous-jacents contrôlant leurs fonctions.

3. Introduction

a. Généralités sur le système immunitaire

Initialement décrit comme spécialisé dans la destruction des microbes, le système immunitaire est également capable de détecter des signaux endogènes, comme les cellules mortes. Ces observations ont conduit à proposer une nouvelle définition du système immunitaire, à savoir un système spécialisé dans la détection des signaux de danger, ceux-ci pouvant être d'origine exogène, comme les microbes, ou endogènes, comme les cellules lésées. La nature de la réponse immunitaire qui sera initiée sera donc dépendante du type de signaux de danger détectés (immunité en réponse aux microbes vs tolérance en réponse aux cellules apoptotiques).

Le système immunitaire repose sur un ensemble d'effecteurs cellulaires et moléculaires qui sont impliqués dans toutes les phases de la réponse immunitaire, allant de la détection à la mise en place d'une mémoire immunitaire. Ces effecteurs s'articulent autour de deux composantes :

- (1) l'immunité innée, qui constitue la 1^{ère} ligne de défense ; elle est immédiate, dès la détection d'un signal de danger, et n'est pas spécifique d'un antigène ;
- (2) l'immunité adaptative qui est mise en place plus tardivement (suite à l'apprêtement antigénique et l'activation des lymphocytes spécifiques d'antigène ; elle est impliquée dans l'initiation d'une mémoire immunologique (Figure 1).

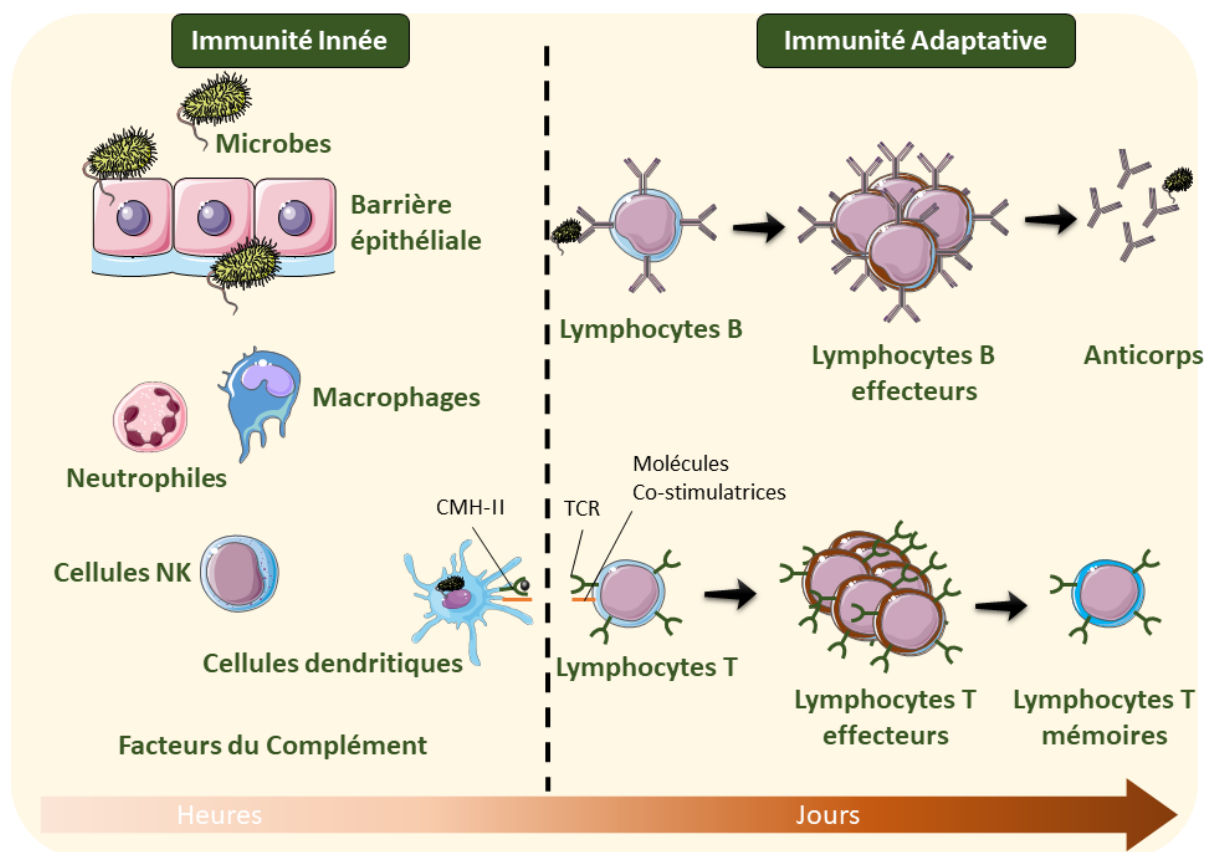


Figure 1 : L'immunité innée et l'immunité adaptative. Le système immunitaire est constitué de deux composantes, l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée intervient dans les premières minutes suivant la détection d'un signal de danger et est peu spécifique. Elle comprend les cellules phagocytaires ainsi que les barrières épithéliales. Les cellules présentatrices d'antigènes présentent les antigènes aux lymphocytes T, permettant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Les cellules effectrices sont les lymphocytes B représentant le bras humoral et les lymphocytes T représentant le bras cellulaire ; les lymphocytes sont le support de la mémoire immunologique. D'après Abbas A.K LAH, Pillai S (2013), Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.

L'immunité innée joue un rôle essentiel dans la détection des signaux de danger : les cellules immunitaires innées participent à l'élimination des composants reconnus (microbes, cellules endommagées) et sont impliquées dans l'initiation d'une réponse adaptative. Différents acteurs interviennent dans cette immunité innée en commençant par les épithéliums, qui constituent des barrières physiques et biochimiques contre l'entrée de pathogène, ainsi que de nombreuses cellules immunitaires aux propriétés phagocytaires. Les acteurs cellulaires de l'immunité innée, comme les macrophages, ont de nombreux rôles qui seront développés dans un prochain paragraphe.

La deuxième composante du système immunitaire, l'immunité adaptative, se développe plus lentement mais se caractérise par la mise en place d'une réponse spécifique d'antigènes et est le support de la mémoire immunologique. Sa mise en place plus lente tient au fait que ce processus nécessite de nombreuses étapes (activation/prolifération/différenciation) pour générer des effecteurs cellulaires efficaces.

1. Les acteurs cellulaires

Les cellules épithéliales, composant les épithéliums continus de la peau ou des tractus digestif, bronchique ou encore uro-génital, forment une frontière imperméable pour les microbes, empêchant leur entrée dans les tissus. En plus de leur fonction de clairance muco-ciliaire, les cellules épithéliales produisent de nombreuses molécules capables de tuer ou neutraliser les microorganismes, tels que des enzymes (lysozyme, phospholipases, peroxydases), des molécules bactéricides (incluant des peptides antimicrobiens ; défensines, cathélicidines) ou encore des petites molécules (ROS ou oxyde nitrique). La sécrétion du mucus joue également un rôle protecteur du fait de caractéristiques chimiques (pH acide) (Porchet and Aubert, 2004; Tieu et al., 2010).

Lorsque les microbes parviennent à contourner cette première ligne défensive, ils se heurtent à une deuxième ligne de défense composée des cellules de l'immunité innée puis aux cellules de l'immunité adaptative et aux facteurs solubles permettant leur élimination. Au sein de l'immunité innée, les cellules immunitaires comprennent :

- des cellules d'origine myéloïde, polynucléées (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et mononucléées (cellules dendritiques, macrophages et monocytes) ;
- des cellules d'origine lymphoïde (cellules Natural Killer (NK), les NKT, les « innate lymphoid cells » (ILC), les lymphocytes T $\gamma\delta$ non conventionnels (LT $\gamma\delta$)).

L'immunité adaptative est composée exclusivement de cellules d'origine lymphoïdes, lymphocytes T conventionnels (« T Cell Receptors » (TCR) $\alpha\beta$) et des lymphocytes B.

a. Les cellules myéloïdes

Les cellules polynucléées (ou granulocytes) sont représentées par les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Ces cellules sont générées dans la moelle osseuse et sont libérées dans la circulation au stade de différenciation terminale. Ces cellules se caractérisent par la présence de granules intracellulaires. Ils participent à l'élimination des microorganismes par phagocytose ou par dégranulation (libération de molécules bactéricides stockées dans des granules intracellulaires). Les

neutrophiles représentent la population de cellules immunitaires la plus importante dans la circulation (environ 70 % des leucocytes). Ils possèdent également la capacité de libérer leur contenu intracellulaire, nucléaire inclus, pour former un réseau extracellulaire d'ADN (NETs, « Neutrophils extracellular traps ») auquel est associé de nombreuses molécules bactéricides (Rosales, 2018); ce processus unique représenterait un élément essentiel de l'arsenal antimicrobien des neutrophiles (Papayannopoulos, 2018).

En condition homéostatique, les neutrophiles sont recrutés dans les tissus en cas d'infection ou d'inflammation, avec une durée de vie de quelques jours en l'absence d'activation ; par comparaison, cette durée de vie peut être de plusieurs semaines pour les éosinophiles et les basophiles (Geering et al., 2013). Les basophiles et les éosinophiles représentent une faible proportion de cellules immunitaires, entre 1 et 5% des leucocytes dans la circulation sanguine (Nadif et al., 2013). Ils présentent un rôle dans l'inflammation notamment dans les réactions allergiques mais aussi dans les réponses antimicrobiennes et principalement antiparasitaire pour les éosinophiles (Rothenberg and Hogan, 2006; Siracusa et al., 2013). Les granulocytes ne sont pas uniquement des cellules « tueuses », puisqu'ils participent à la régulation des réponses immunitaires, notamment via la production de médiateurs solubles comme des cytokines (pro ou anti-inflammatoires) libérées dans le milieu extracellulaire par dégranulation. Les granulocytes sont principalement éliminés par les macrophages par phagocytose (Geering et al., 2013).

Les cellules mononucléées comprennent les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques myéloïdes (DC ou dendritic cells). Les monocytes sont des cellules issues de la moelle osseuse et sont uniquement circulantes dans le sang où elles représentent entre 2 % et 10 % de l'ensemble des leucocytes, avec une durée de vie d'environ 24 heures. En cas d'infection/inflammation, les monocytes sont recrutés dans les tissus où ils peuvent se différencier en DC ou en macrophages, en fonction de la nature des signaux reçus localement. Les DC à l'état immature capturent les antigènes ; si elles reçoivent concomitamment un signal d'activation, elles vont migrer vers les organes lymphoïdes drainants. Durant cette migration, les DC vont subir un processus de maturation les rendant capables d'activer les LT naïfs (processus de priming). Les macrophages restent exclusivement tissulaires même après la capture d'antigène et/ou activation.

Les monocytes, les macrophages et les DC possèdent la capacité de capturer les antigènes et de les présenter via les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et de classe II (CMH-II) aux cellules de l'immunité adaptative. Les cellules mononucléées sont donc des cellules

présentatrices d'antigènes (CPA) ; néanmoins, les DC sont qualifiées de CPA professionnelles du fait de leur capacité unique à présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs. Les macrophages ne sont capables d'activer que les lymphocytes T mémoires présents également dans les tissus ; leurs propriétés seront détaillées dans un chapitre dédié à la biologie des macrophages. La capacité des CPA de capter et présenter un antigène vient du fait qu'elles présentent une activité d'endocytose et de phagocytose intrinsèque ; plus importante pour les DC immatures. Localisées à l'interface entre l'immunité innée (capture d'antigènes et présentation antigénique) et l'immunité adaptative (capacité d'activer les lymphocytes T), les CPA jouent donc un rôle crucial dans l'initiation et la régulation des réponses immunitaires adaptatives, mais également dans la régulation de l'inflammation par la production de cytokines pro ou anti-inflammatoires et de chimiokines.

b. Les cellules d'origine lymphoïde

i. Les cellules de l'immunité innée d'origine lymphoïde

Les cellules de l'immunité innée d'origine lymphoïde comprennent les cellules NK qui représentent la population majoritaire d'origine lymphoïde de l'immunité innée et 5 à 20% des lymphocytes circulants chez l'homme (Abel et al., 2018). Elles sont présentes à la fois dans le sang, les organes lymphoïdes et les tissus périphériques. Les cellules NK possèdent des granules contenant de nombreux médiateurs régulateurs (cytokines et chimiokines) et cytotoxiques (perforines, granzymes), préformés et libérés rapidement lorsqu'elles reconnaissent leurs cibles. Contrairement aux LT, les cellules NK sont produites en dehors du thymus et ne présentent pas de TCR. Elles sont pourvues de récepteurs hétérodimériques activateurs ou inhibiteurs après liaison au CMH-I, tels que CD94/NKG2C activateur ou CD94/NKG2A inhibiteur ou encore des récepteurs appartenant à la famille « Killer Immunoglobuline-like Receptors » (KIR) (Freud et al., 2017). Lorsque la cellule cible n'exprime pas ou peu de CMH-I ou un CMH-I différent du soi, aucun signal d'inhibition s'oppose au signal d'activation (interaction des récepteurs activateurs aux ligands de la cellule cible) dont résulte une destruction.

Les cellules NKT présentent, à la différence des cellules NK, un TCR réarrangé impliqué dans la reconnaissance d'antigènes lipidiques présentés par CD1d, glycoprotéine exprimée à la surface des CPA. Il a été décrit qu'elles peuvent moduler les réponses immunitaires notamment l'activation des lymphocytes B par la dégranulation de nombreuses cytokines (Zeng et al., 2013). Du fait que ces cellules partagent des caractéristiques des cellules lymphocytaires innées (cellules granulaires avec

production de cytokines rapides après activation) et des lymphocytes conventionnels, elles représentent une population liant les deux immunités (Bennstein, 2017).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$ intraépithéliaux, également appelés lymphocytes T non conventionnels, expriment un TCR composé de chaînes γ et δ peu diversifié (Vermijlen et al., 2018). Ces cellules ont la particularité de reconnaître de multiples antigènes en l'absence de molécule CMH, notamment des antigènes exprimés par les cellules lors d'un stress. Cette reconnaissance entraîne l'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$ qui se manifeste par la production de cytokines (IFN- γ , TNF et IL-17) ou des médiateurs cytotoxiques (granzymes) permettant ainsi l'élimination de microbes, la régulation de l'inflammation et le contrôle de l'homéostasie tissulaire (Lawand et al., 2017).

Parmi les acteurs cellulaires d'origine lymphoïde de l'immunité innée, les « Innate Lymphoid Cells » (ILC) ont été découvertes dans le début des années 2000. Les ILC se répartissent en 3 groupes, les ILC1, ILC2 et ILC3 et présentant des fonctions spécifiques à l'image de la classification des lymphocytes T auxiliaires (Th1, Th2 et Th17). N'exprimant pas les enzymes de recombinaison « Recombination Activating Gene » (RAG), elles sont donc dépourvues de récepteur de l'antigène généré par réarrangements géniques (tels que ceux exprimés par les lymphocytes T et B) (Spits et al., 2013). Les ILC1, comme les Th1, interviennent, après activation par les interleukines (IL) IL-12, IL-15 et IL-18, dans l'élimination des cellules tumorales et de pathogènes intracellulaires (tels que les virus) par sécrétion d'IFN γ et de TNF α . Les ILC2 ont un rôle dans l'élimination des parasites extracellulaires et des allergènes. Elles permettent la mise en place d'une réponse de type Th2 en sécrétant IL-4, IL-5 et IL-13 après activation par IL-25 ou IL-33. Enfin, les ILC3 permettent l'élimination des microbes extracellulaires (bactéries et champignons) et possèdent, comme les cellules Th17 la capacité de produire de l'IL-17 et de l'IL-22. Elles sont le plus souvent retrouvées dans les muqueuses où elles interviennent dans l'homéostasie de la flore commensale intestinale (Crinier et al., 2017; Vivier et al., 2018).

ii. Les cellules de l'immunité adaptative d'origine lymphoïde

La majorité des cellules lymphoïdes correspondent aux cellules de l'immunité adaptative que sont les lymphocytes T conventionnels (TCR $\alpha\beta$) et les lymphocytes B.

Les lymphocytes T (LT) sont produits dans le thymus où a lieu leur maturation à partir d'un précurseur cellulaire d'origine médullaire. Les LT ont comme caractéristique d'exprimer de manière clonale un TCR spécifique pour un antigène, composé de chaînes α et β . Ce TCR est associé au CD3 et CD4 ou CD8, distinguant deux familles de LT, les LT CD4+ et les LT CD8+ qui reconnaîtront, respectivement,

les antigènes présentés par le CMH-II et le CMH-I (Kumar et al., 2018). La première rencontre avec l'antigène spécifique du TCR, présenté par les DC matures, se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette activation des LT naïfs nécessite 3 signaux, le premier est médié par la liaison CMH-TCR, le deuxième est donné par l'interaction de molécules costimulatrices exprimées par la CPA aux ligands exprimés par les LT et, le troisième signal, qui conditionne la polarisation des LT effecteurs, est fourni par les cytokines libérées par la DC. Les lymphocytes T effecteurs comprennent, pour les CD4+, les différents sous-types de lymphocytes T auxiliaires tels que Th1, Th2, Th17 ou encore les lymphocytes T régulateurs et, pour les LT CD8+, les LT cytotoxiques et les lymphocytes T régulateurs. La classification des lymphocytes T auxiliaires est basée sur le profil des cytokines qu'elles produisent et sur leur fonction propre (Zhu et al., 2010). Les lymphocytes Th1 produisent des cytokines IL-2, IFN- γ et TNF- α et sont impliqués dans les réponses antimicrobiennes et antitumorales (Knutson and Disis, 2005; Zhu et al., 2010). Les lymphocytes Th2 sont caractérisés par la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-13 et ont un rôle dans les réponses antiparasitaires et dans les pathologies allergiques (Nakayama et al., 2017). Les lymphocytes Th17, caractérisés par la production d'IL-17, sont impliqués dans la réponse inflammatoire (Sandquist and Kolls, 2018). Enfin plus récemment a été décrit la population Th22, produisant l'IL-22, impliquée dans l'immunité muqueuse et la population Th9, produisant l'IL-9, impliquée dans l'immunité antitumorale et dans les pathologies allergiques (Kaplan, 2013; Kim et al., 2012). Les LT cytotoxiques participent à l'élimination des cellules tumorales et des cellules infectées par des pathogènes intracellulaires via la production de médiateurs cytotoxiques (perforine et granzymes) ou encore par l'expression de « récepteur de mort » comme FAS ligand ou TRAIL (Barry and Bleackley, 2002). Les lymphocytes T régulateurs permettent de maintenir une tolérance immunologique vis-à-vis du soi ou encore de réguler la réponse immunitaire après infection par l'expression de cytokines immunorégulatrices (IL-10 et TGF- β) (Luckheeram et al., 2012). Après activation, différenciation et prolifération, les LT effecteurs migrent vers les foyers infectieux le temps de la réponse inflammatoire. En raison d'un support de la mémoire immunologique par l'immunité adaptative, un pool de LT effecteurs pourra se différencier en LT mémoires qui seront réactivés lors d'une nouvelle rencontre de l'antigène. Cette activation, plus rapide, se déroule dans les tissus et peut être induite par des CPA autres que les DC, ainsi que par des cellules n'exprimant que le CMH-I, activant dans ce cas uniquement les LT mémoires (Kumar et al., 2018).

Tout comme les LT, les lymphocytes B (LB) subissent une maturation, dans la moelle osseuse et deviennent matures naïfs circulants dans l'organisme entre les différents organes lymphoïdes

secondaires. Les LB naïfs folliculaires présentent un « B Cell Receptor » (BCR) qui est constitué de deux types d'immunoglobulines (IgM et IgD) leur permettant de reconnaître un antigène spécifique de façon clonale et des molécules transductrices CD79a et b (Ig α et Ig β) (Chu and Arber, 2001; Noviski et al., 2018). Dans le cas d'antigènes thymo-dépendants, l'activation des LB nécessite la présence d'un antigène reconnu par le BCR et des signaux fournis par les LT auxiliaires via l'interaction TCR/CMH-II renforcée par la liaison de molécules de costimulation. Cette interaction augmente l'expression du CD40 exprimé par les LB et son ligand CD40L exprimé par les LT auxiliaires fournissant un signal essentiel à l'activation des LB. En retour l'interaction du LT auxiliaire avec le LB achève la différenciation en lymphocytes « T follicular helper » (Tfh). Le Tfh sécrète des cytokines qui participent également à l'activation du LB, tels que IL-2, IL-4 et IL-21 (Crotty, 2011). L'activation des LB entraîne leur différenciation en plasmocytes, cellules sécrétrices d'immunoglobulines. Chez une personne de 70 Kg, environ 8 g d'immunoglobulines sont produites par jour (Jacquot and Boyer, 2006). Les immunoglobulines, présentes dans le sang et les fluides de l'organisme, participent à l'élimination des cibles par différentes voies :

- l'activation du complément
- l'opsonisation des microorganismes permettant leur élimination par phagocytose via les macrophages ou neutrophiles exprimant à leur surface des récepteurs spécifiques de la partie Fc de l'immunoglobuline
- « Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity » (ADCC) par les lymphocytes (Rajasekaran et al., 2015)

Les lymphocytes B mémoires à durée de vie longue représentent le support de la mémoire humorale.

Il est important de noter que la présentation antigénique lymphocytaire est soumise à de nombreux « checkpoints » contrôlant ce processus, tels que l'expression de molécules co-inhibitrices par les CPA ou encore la présence de LT régulateurs permettant de limiter l'amplitude et la durée d'activation des lymphocytes effecteurs et empêchant, notamment, l'activation de lymphocytes auto-réactifs (Kumar et al., 2018).

2. Les acteurs moléculaires

Au sein de l'immunité innée, en plus de la composante cellulaire, existe de nombreux facteurs solubles qui constituent la composante humorale. Ces facteurs solubles incluent les collectines, les ficolines et les pentraxines qui sont regroupés sous le terme de « Pattern Recognition Molecule » (PRM) (tableau 1). Ces PRM reconnaissent et se fixent sur des motifs endogènes comme exogènes

reconnus comme des signaux de dangers. La fixation entraîne leur neutralisation et leur agrégation facilitant leur élimination par phagocytose. Les PRM présentent une activité d'opsonisation similaire aux facteurs du complément qui leur attribue l'appellation d'opsonine. Ainsi, ces PRM ont un rôle de pont moléculaire entre les motifs de danger reconnus et les récepteurs d'endocytose exprimés par les phagocytes. Les neutrophiles, les macrophages et les DC représentent les sources majoritaires de ces PRM (Doni et al., 2019).

Tableau 1 : Les récepteurs ou molécules intervenant comme senseurs de l'immunité innée et les principaux membres de leur famille.

	Localisation	Famille	Membres
Pattern Recognition Molecule ou PRM	Extracellulaire	Collectines	C1q, MBL, SP-A, SP-D, CL-43, CL-46, CL-P1, CL-L1, CL-K1
		Ficolines	Ficolin-1, Ficolin-2, Ficolin-3
		Pentraxines	PTX3, CRP, SAP
Pattern Recognition Receptors ou PRR	Membrane plasmique	TLR membranaires	TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6
		Récepteurs d'épuration ou Scavenger receptor (SR)	SR de A à L
		Récepteurs C-type lectin-like (CLR)	Mincle, Dectin-1, DNGR-1, MICL, CLEC1, CLEC2
	Endosomes	TLR endosomaux	TLR3, TLR7, TLR8, TLR9
	Cytoplasme	Récepteurs de type NLR	NOD-1, NOD-2, NLRA, NLRB, NLRC3-5, NLRX1, NLRP1-14
		Récepteurs de type RLR	RIG-1, MDA5, LGP2
		Récepteurs de type ALR	AIM2, IFI16, STING, cGAS, DNA-PK, DDX41, Rad50, DAI

Les collectines présentent une partie similaire au collagène et une partie lectine à six domaines « Carbohydrate Recognition Domain » (CRD), qui reconnaît des sucres (mannose, fucose) présents à la surface des microbes. Les collectines (MBL, SP-A et SP-D) présentent aussi la capacité de se lier aux cellules apoptotiques, dont la nature des motifs reste inconnue, et de faciliter leur élimination par les macrophages alvéolaires (Vandivier et al., 2002). Bien qu'étant dépourvue de motif CRD, la protéine C1q appartient également à la famille des collectines sur la base d'homologies structurales et fonctionnelles. Le système du complément représente l'un des principaux bras effecteurs de la réponse immunitaire innée contre les pathogènes (Bottazzi et al., 2010). Par l'activation du complément, C1q est impliqué dans la phagocytose des bactéries, la neutralisation de virus et le maintien de la tolérance (élimination des cellules apoptotiques) (Stoermer and Morrison, 2011).

Chez l'Homme, 3 ficolines ont été décrites et leur structure est semblable aux collectines ; néanmoins, les ficolines ne possèdent pas de CRD mais présentent un domaine de type fibrinogène organisé sous la forme d'une structure globulaire similaire à celle du CRD. Ce domaine participe également à la reconnaissance de motifs microbiens, notamment des motifs glucidiques des bactéries Gram positif et négatif (N-acétylmannosamine et N-acétylglucosamine) et à leur élimination par la voie des lectines du complément (Endo et al., 2011).

Enfin, les pentraxines sont classées en deux groupes, les pentraxines courtes, composées de « C reactive protein » (CRP) et « Serum amyloid P component » (SAP), et les pentraxines longues composées de plusieurs protéines dont la molécule « Pentraxin 3 » (PTX3) constitue le prototype. Elles interviennent dans la reconnaissance de motifs de nombreux microorganismes (champignons, bactéries, virus et parasites) facilitant leur élimination par phagocytose. Elles participent également à l'élimination des cellules mortes, notamment par la reconnaissance de chromatine (qui s'accumule à la surface des cellules mortes) ou encore des molécules ribonucléaires. L'agrégation des pentraxines sur les éléments ciblés entraîne l'activation de la voie alterne et de la voie classique du complément par interaction avec C1q (Bottazzi et al., 2010).

L'autre famille de molécules impliquées dans la détection des signaux de danger est composée des récepteurs cellulaires appelés « Pattern Recognition Receptors » (PRR) (Tableau 1). Ces PRR sont localisés dans la membrane plasmique, dans le cytoplasme ou dans les endosomes. Les PRR peuvent avoir un rôle dans l'endocytose et/ou dans la signalisation cellulaire. Les récepteurs intervenant dans l'endocytose comprennent, principalement, les récepteurs d'épuration ou « scavenger receptors » (SR) et les « C-type lectin receptors » (CLR). Définis comme des récepteurs fixant les LDL oxydés, les SR fixent de nombreux éléments, microbiens et endogènes (cellules mortes, molécules altérées, acides nucléiques) (Canton et al., 2013). Les CLR constituent un large groupe dont les protéines portent un domaine « C-type lectin-like domain » (CTLD) impliqué dans la reconnaissance de carbohydrates de manière dépendante du calcium (Chiffolleau, 2018; Hoving et al., 2014). Les CLR présentent également des propriétés de signalisation conduisant à l'activation de la voie NF- κ B (Loeb and Drickamer, 1988). Parmi les récepteurs ayant des propriétés de signalisation, les « Toll-like receptors » (TLR) sont exprimés au niveau de la membrane plasmique (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, et TLR6) ou au niveau des endosomes (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9). Les TLR fixent une grande diversité de ligands. Ils peuvent être de nature endogènes provenant des tissus ou des cellules de l'organisme, tels que des « Apoptotic Cell-Associated Molecular Patterns » (ACAMP), des protéines ou des peptides (fibrinogène et fibronectine) (Gregory and Devitt, 2004; Yu et al., 2010). Ils peuvent également être de nature exogènes, tels que des « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMP), comme les LPS par TLR4 ou les acides nucléiques microbiens par les TLR endosomiaux (Kawasaki and Kawai, 2014). L'engagement des TLR conduit à l'activation des voies IRAK/TRAF, MAPK, IRF ou NF- κ B, aboutissant à la synthèse de médiateurs inflammatoires (tels que IL-6, IL-12, TNF α) et/ou antiviraux (tels que les interférons de type I) (Kawasaki and Kawai, 2014). Dans certains cas, la signalisation des TLR nécessite une coopération avec des SR comme cela a été décrit dans la neuro-

inflammation induite par TLR2 nécessitant un assemblage avec le récepteur SR, CD36 (Abe et al., 2010) Enfin, il existe des récepteurs présents dans le cytoplasme et reconnaissant des motifs bactériens et viraux mais aussi des motifs du soi cytosoliques. Ces récepteurs comprennent les récepteurs de la famille « NOD-like receptors » (NLR), « RIG-like receptor » (RLR) et la famille « AIM2-like receptors » (ALR). La liaison de ces récepteurs à leurs ligands conduit notamment à la formation de l'inflammasome pour les récepteurs NLR et ALR (Dostert et al., 2008; Fernandes-Alnemri et al., 2009) tandis que l'engagement des récepteurs RLR (senseur des ARN viraux double brin) conduit à une activation des molécules MyD88 et MAVS (Reikine et al., 2014).

b. Biologie des macrophages

Les macrophages ont été décrits pour la première fois en 1883 par Metchnikoff comme étant des phagocytes. Présents dans tous les tissus de l'organisme, ils présentent une grande plasticité fonctionnelle, allant de l'immunité antimicrobienne à l'homéostasie tissulaire en passant par la réparation tissulaire.

i. Origine(s)

1. Ontogénie des macrophages

Les données sur l'origine des macrophages résidents dans les tissus proviennent essentiellement d'études menées chez la souris.

La colonisation des tissus par les macrophages se déroule en plusieurs étapes successives dès les premiers stades du développement (Figure 2). Dans un premier temps, au jour embryonnaire (E) 8 chez la souris, au cours de l'hématopoïèse primitive, se développent les érythroblastes, les mégacaryocytes et les macrophages à partir des îlots sanguins issus du mésoderme du sac vitellin (Ginhoux and Guilliams, 2016; Hoeffel and Ginhoux, 2018; Wynn et al., 2013). Cette étape primitive est suivie par l'hématopoïèse définitive qui se déroule transitoirement dans le foie fœtal à partir des progéniteurs érythromyéloïdes (EMP), formés dans le sac vitellin et qui sont circulants vers E8.5, avec la mise en place de la circulation sanguine. Ces EMP permettent la génération de cellules érythrocytaires et myéloïdes, dont les monocytes (Ginhoux and Guilliams, 2016). Dans l'étude de Hoeffel (Hoeffel et al., 2015), les auteurs discriminent deux types d'EMP, (i) les EMP précoces qui, au cours de la phase primitive à E7.5, donnent naissance principalement aux macrophages primitifs et (ii) les EMP tardifs à E8.25, ces EMP permettront toujours la génération de macrophages issus du sac Vitellin et qui migreront dans le foie fœtal à E9.5 pour induire les progéniteurs myéloïdes (incluant les premiers monocytes fœtaux).

L'apparition des macrophages dans les tissus débute dès la mise en place de la circulation sanguine. Dans le cerveau, les macrophages résidents (microglie) proviendraient exclusivement des macrophages primitifs (Ginhoux et al., 2010). Vers E13.5, les monocytes fœtaux vont gagner la circulation puis tous les tissus de l'embryon remplaçant les premiers macrophages, à l'exception du cerveau dû à la mise en place de la barrière hémato-encéphalique (Hoeffel and Ginhoux, 2018). Vers E10.5, une troisième vague de progéniteurs ou cellules souches hématopoïétiques (CSH) immatures se forme à partir de la région de l'aorte dorsale (région aorte-gonade-mésonephros) et dans les artères ombilicales et vitellines pour donner des CSH matures dans le foie fœtal. Ces CSH présentent une activité proliférative et constitueront un stock suffisant de cellules dans le foie pour coloniser la moelle osseuse lorsque cette dernière sera formée vers E17.5 (Hoeffel and Ginhoux, 2018). Les CSH ont la capacité de multipotence pouvant donner naissance à un progéniteur myéloïde se différenciant en progéniteur commun « granulocyte, monocyte and dendritic cell progenitor » (GMDP). Les monocytes et les DC partagent un même progéniteur appelé « monocyte and dendritic cell progenitor » (MDP). Le MDP produit un précurseur de monocytes (cMOP) et un précurseur des DC (Breton, 2015). Chez l'adulte, les monocytes assurent le maintien du pool de macrophages résidents à longue vie en cas d'inflammation mais aussi à l'équilibre pour préserver l'homéostasie tissulaire. Chez l'Homme, il est accepté que les monocytes du sang périphérique sont les précurseurs des macrophages tissulaires participant au maintien du pool des macrophages résidents par leur recrutement local via des cytokines (M-CSF) ou des chimiokines (CCL2). Des études chez la souris ont mis en évidence ce mécanisme dans le derme, l'intestin, le foie, la rate et la cavité péritonéale (Hoeffel and Ginhoux, 2018). Cependant, il a été démontré chez la souris que les macrophages résidents peuvent proliférer, permettant également de maintenir le pool de macrophages tissulaires (Bosurgi et al., 2017; Jenkins et al., 2011).

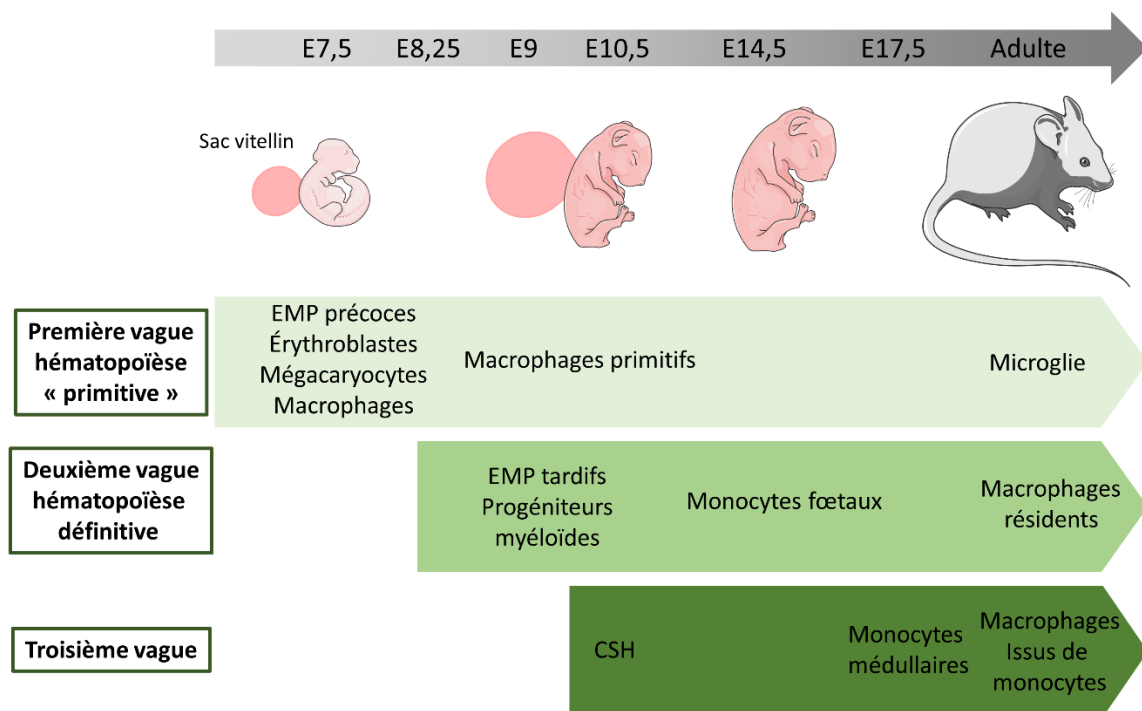


Figure 2 : Ontogénie des macrophages chez la souris. Dès les premiers stades embryonnaires, au cours de l'hématopoïèse primitive, les premiers macrophages sont formés et permettent la formation de la microglie chez l'adulte. Une deuxième vague, à partir des progéniteurs érythromyéloïdes (EMP) qui sont formés dans le sac vitellin donnent les macrophages tissulaires et les premiers monocytes fœtaux via les EMP tardifs. Enfin, la troisième vague permet la génération de monocytes et de macrophages issus des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Figure adaptée (Hoeffel and Ginhoux, 2018).

2. Facteurs de survie et de différenciation

Trois cytokines sont impliquées dans la génération et la survie des macrophages humains: IL-34, « Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor » (GM-CSF) et « Macrophage Colony-Stimulating factor » M-CSF (Figure 3). Chez la souris, seul le M-CSF permet la survie et la différenciation des monocytes en macrophages.

Le M-CSF, ou CSF-1, est une protéine de 554 acides aminés codée par le gène *csf-1* localisé sur le chromosome 1 (1p13.3) chez l'Homme. M-CSF est exprimé constitutivement et de façon ubiquitaire (Hamilton et al., 2016). Du fait de son rôle dans la survie et la différenciation des monocytes en macrophages, des souris déficientes en M-CSF (*Csf1^{op/op}*) présentent une ostéoporose précoce due à une diminution du nombre d'ostéoclastes ainsi que de sévères retards de développement et de croissance (Dai et al., 2002; Hamilton, 2008). Le récepteur décrit au M-CSF est CD115 (ou CSF1R), récepteur de type tyrosine kinase couplé aux voies de signalisation PI3K/Akt et Grb2/MAPK.

L'expression du CD115 est retrouvée sur les cellules de la lignée monocyttaire, les cellules endothéliales, les trophoblastes, les progéniteurs neuraux et les cellules épithéliales (Dai et al., 2002).

L'IL-34, protéine de 224 acides aminés, est codée par le gène *il34* situé sur le chromosome 16 humain (16q22.1). Trois récepteurs ont été décrits pour l'IL-34 : CD115 pour lequel elle possède une plus grande affinité que le M-CSF, PTP ζ , exprimé dans le système nerveux central et le rein, et CD138, exprimé de façon ubiquitaire et impliqué dans la migration des cellules myéloïdes (Segaliny et al., 2015). A l'inverse du M-CSF, IL-34 a une expression constitutive restreinte à l'épiderme cutané et au cerveau. Elle joue donc un rôle important dans la survie et la différenciation de la microglie et des cellules de Langherans (Wang et al., 2012).

Le GM-CSF (ou CSF-2) est une protéine de 144 acides aminés, codée par le gène *csf2* localisé sur le chromosome 5 humain (5q31.1). Le récepteur décrit au GM-CSF est un hétérodimère composé d'une chaîne α de faible affinité (CSF2R α ou CD116) et d'une chaîne β transduisant le signal (CSF2R β ou CD131). CD116 est exprimé par les cellules endothéliales, les monocytes et les macrophages, les granulocytes et les lymphocytes. La fixation du ligand sur cet hétérodimère active le facteur de transcription STAT5 et la voie de signalisation PI3K/Akt (Hamilton et al., 2016). Chez un sujet sain à l'état normal, le GM-CSF est indétectable dans la circulation, à la différence des deux autres facteurs de survie et de différenciation. En effet, le GM-CSF est uniquement produit en réponse à une activation cellulaire par les macrophages, LT, LB, cellules endothéliales ou encore fibroblastes (Hamilton, 2008; Hamilton et al., 2016). Le GM-CSF présente également un rôle dans le maintien du pool de macrophages tissulaires, en particulier dans l'intestin et les poumons (Lavin et al., 2015) et intervient également dans la différenciation des DC et des granulocytes.

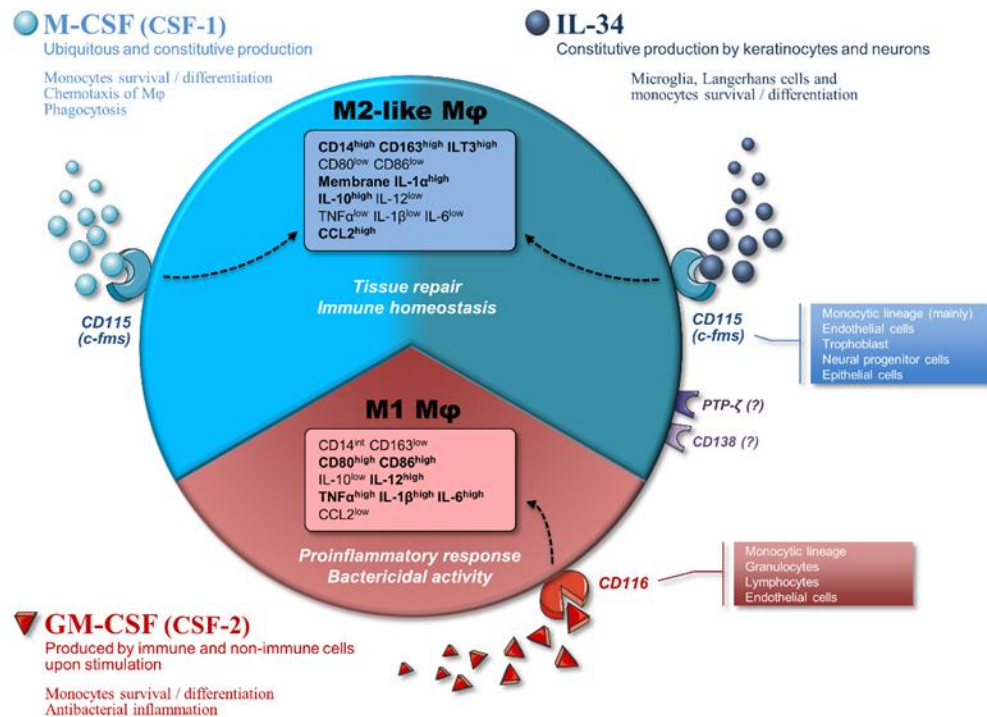


Figure 3 : Les facteurs de survie et de différenciation des macrophages humains. Représentation graphique des effets du M-CSF, de l'IL-34 et du GM-CSF sur la génération de macrophages M2 et M1, respectivement. Schéma tiré de (Jeannin et al., 2018).

ii. Diversités phénotypiques et rôles physiologiques des macrophages

1. Rôles physiologiques des macrophages

Les macrophages possèdent de nombreux rôles physiologiques qui vont au-delà de leur simple activité immunitaire. Certains de ces rôles seront similaires entre tous les macrophages de l'organisme (Figure 4) mais certains rôles seront spécifiques en fonction du tissu dans lequel ils sont localisés. Il est clairement établi aujourd'hui que la diversité phénotypique et fonctionnelle des macrophages est conditionnée par la nature des signaux présents localement (exprimés par les cellules de l'environnement). Ces signaux orientent donc le macrophage vers l'acquisition d'un profil adapté pour répondre à un microbe, une lésion tissulaire ou une cellule apoptotique. Cette capacité à s'adapter à une très grande diversité de signaux s'appelle plasticité fonctionnelle (Xue et al., 2014).

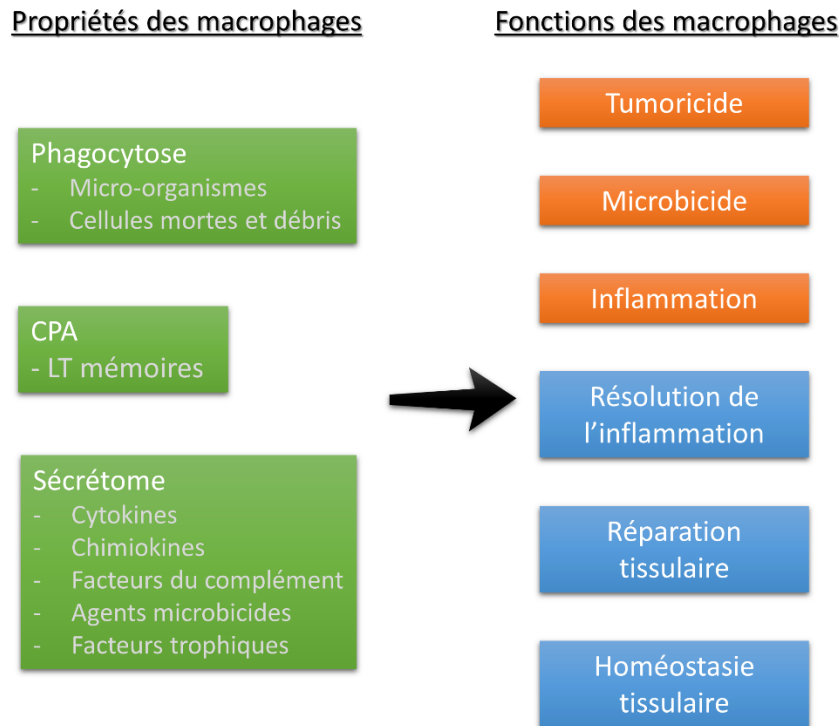


Figure 4 : Propriétés et fonctions des macrophages. Les macrophages sont des cellules d'origine myéloïde, intervenant dans l'immunité innée, avec des propriétés de phagocytose et de sécrétion de médiateurs solubles trophiques, pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. Les macrophages étant également des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), ils permettent l'élaboration d'une réponse immunitaire adaptative. Toutes ces propriétés confèrent aux macrophages de nombreuses fonctions au cours de processus physiologiques.

a. Phagocytose

La phagocytose est un processus permettant d'internaliser des micro-organismes ou des cellules apoptotiques afin de les éliminer. Cette propriété est commune à toutes les cellules myéloïdes mononucléées (monocytes, macrophages et DC) et polynucléées (neutrophiles). La détection des éléments à phagocyter s'effectue via différents récepteurs membranaires. Cependant le phénotype induit est très différent en fonction de la nature des éléments internalisés : alors que la phagocytose des microbes induit, généralement, un profil inflammatoire, l'internalisation des cellules en apoptose précoce induit un profil immunorégulateur (Gordon, 2016). La phagocytose peut être directe (via les PRR) ou indirecte (via les récepteurs aux immunoglobulines membranaires ou aux facteurs du complément). Les PRR reconnaissent directement des motifs présents sur des cellules apoptotiques, tels que les phosphatidyles sérines alors que les récepteurs membranaires comme les récepteurs Fc (FcR) : les récepteurs activateurs FcγRI, FcγRIIA et FcγRIII, le récepteur inhibiteur FcγRIIB et les récepteurs au complément (CR) : CR1, CR2, CR3 et CR4 sont dit récepteurs d'opsonisation car

ils reconnaissent, respectivement, les immunoglobulines et les facteurs du complément facilitant la phagocytose indirecte (Gordon, 2016; Rosales and Uribe-Querol, 2017). La liaison à un récepteur permet « l'engloutissement » de la particule par un mécanisme dépendant de la composition des phosphoinositides permettant la création de pseudopodes puis du phagosome après endocytose. Par la suite, les phagosomes fusionnent avec des endosomes et des lysosomes formant des phagolysosomes où sont présents un arsenal d'effecteurs antimicrobiens et hydrolitiques tels que des anions superoxydes, des ROS, du NO ainsi que des protéines et enzymes lysosomiales (Flannagan et al., 2012).

En présence de signaux de dangers, les PRR vont reconnaître des motifs de cellules endommagées ou microbiens. A titre d'exemple, Dectin-1 reconnaît le β -glucane présent sur certains des champignons et bactéries. Les SR, les CLR et les TLR reconnaissent des PAMP, comme le LPS, ou des « Damage-Associated Molecular Patterns » (DAMP), tels que des protéines du réticulum endoplasmiques ou nucléaires (Poon et al., 2014; Roh and Sohn, 2018). Ceci conduira à la phagocytose et entraînera une activation cellulaire en réponse à la détection du signal de danger.

b. Activité inflammatoire

La réaction inflammatoire est un mécanisme de défense contre un micro-organisme ou le soi endommagé, caractérisée initialement par l'activation du système immunitaire et principalement de sa composante innée, impliquant notamment les macrophages (Oishi and Manabe, 2018). Suite à la détection et/ou la phagocytose d'éléments étrangers, les macrophages tissulaires activés produisent de nombreuses cytokines et chimiokines permettant de répondre au signal de danger. L'intensité de la sécrétion est directement corrélée à la concentration des signaux de danger présents dans l'environnement du macrophage (Santos et al., 2006). Sont produites des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-1 β , le TNF α , et des cytokines permettant la mise en place d'une réponse pro-Th1, via la synthèse d'IL-12 ou d'une réponse pro-Th17, via la synthèse d'IL-23 ou d'IL-21. De nombreuses chimiokines interviennent dans le recrutement des cellules myéloïdes et lymphoïdes sur le site de l'inflammation (Atri et al., 2018).

c. Résolution de l'inflammation

Une fois l'élimination des micro-organismes ou des cellules lésées réalisée, les macrophages participent à la résolution de l'inflammation nécessaire pour la réparation tissulaire et éviter une chronicité potentiellement délétère. Cette étape implique la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, telles que IL-10 et TGF- β (Wynn and Vannella, 2016). Les macrophages peuvent

également atténuer l'inflammation en sécrétant, dans des vésicules, les médiateurs SOCS1 et SOCS3 qui seront captés par les cellules épithéliales, inhibant les facteurs de transcription STAT3 et STAT1 et empêchant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Bourdonnay et al., 2015). La composition de l'environnement participe également à la résolution de l'inflammation ; ainsi, des lipoprotéines de haute densité ou « High-density lipoprotein » (HDL), inhibent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (De Nardo et al., 2014).

d. Réparation tissulaire et cicatrisation

Les macrophages ont un rôle majeur dans la réparation tissulaire et la cicatrisation (Figure 5) (Minutti et al., 2017). La réparation tissulaire peut, schématiquement, être divisée en 4 étapes successives : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire (Ding and Tredget, 2015; Thiruvoth et al., 2015). Une étude dans un modèle murin a montré que la déplétion des macrophages induit des défaillances dans la réparation tissulaire et la cicatrisation, telles que : une néovascularisation réduite, une hémorragie sévère dans les tissus de la plaie, l'altération de la régénération de l'épithélium et de la formation d'une cicatrice (Lucas et al., 2010). Des résultats similaires ont été observés sur la salamandre adulte qui perd la capacité régénératrice de ses membres après déplétion des macrophages (Godwin et al., 2013). Dès les premiers temps après l'apparition de la blessure, les plaquettes initient la formation du caillot sanguin et sécrètent des médiateurs permettant, respectivement, le recrutement et la migration des macrophages et des fibroblastes (Piran et al., 2018; Thiruvoth et al., 2015). De nombreux DAMP et PAMP agissent sur les macrophages et entraînent leur activation, qui initie la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines comme dit précédemment. A la suite de l'inflammation et de la résolution de l'inflammation, les macrophages, via la sécrétion de facteurs de croissance comme TGF- β et VEGF-A, agissent sur la différenciation des myofibroblastes pour fermer la blessure et sur les cellules endothéliales pour former de nouveaux vaisseaux. Les macrophages sécrètent également d'autres facteurs de la famille des « Epithelial Growth Facteur » (EGF), tels que HB-EGF, OSM et PDGF, qui induisent la migration et la prolifération des kératinocytes et des fibroblastes nécessaires à la régénération tissulaire (Krzyszczuk et al., 2018; Pohin et al., 2016; Shirakata et al., 2005). Enfin, au cours du remodelage tissulaire, les macrophages participent activement à la décomposition des composants de la matrice extracellulaire notamment via la sécrétion de métalloprotéases (MMP) qui dégradent les protéines de la matrice cicatricielle et les éliminent par phagocytose. En effet, le dépôt de collagène doit s'arrêter, sinon sa scarification causera une perte de la fonction tissulaire. Par conséquent, la dégradation et la reconstruction de la matrice, qui caractérisent les étapes finales du

processus de cicatrisation, doivent être contrôlées pour assurer la pérennité du tissu lésé et éviter sa scarification (Minutti et al., 2017).

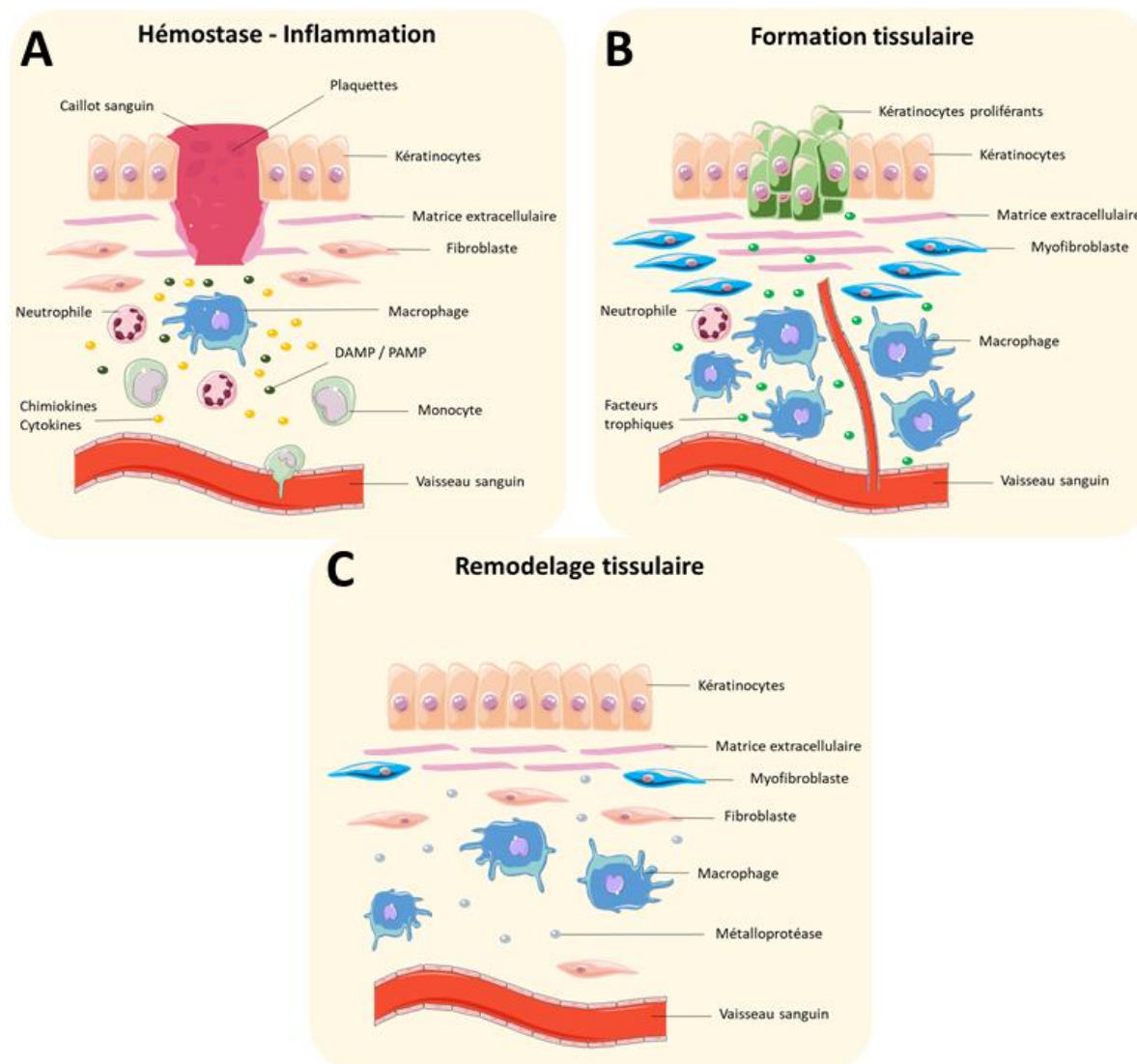


Figure 5 : Mécanismes de réparation tissulaire et de cicatrisation. Résumé de la réparation tissulaire et de la cicatrisation qui est composée d'un enchaînement de 4 étapes : l'hémostase, l'inflammation (A), la formation tissulaire (B) et le remodelage tissulaire (C). Les macrophages ont un rôle crucial dans chacune de ces étapes. Ils interviennent dans le recrutement et la mise en place d'une réponse inflammatoire, de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et de la prolifération des kératinocytes à l'origine de la fermeture de la blessure et du tissu néoformé et ils participent enfin au remodelage tissulaire. Figure adapté de (Minutti et al., 2017).

e. Rôles spécifiques des macrophages tissulaires

Certains macrophages tissulaires présentent des fonctions spécifiques propres au tissu dans lequel ils se trouvent.

Les ostéoclastes participent au remodelage osseux. Ils sont générés à partir de monocytes en présence de la cytokine RANKL, notamment exprimée par les cellules stromales de la moelle osseuse. Les ostéoclastes participent à la résorption osseuse, ils sécrètent des protons et des enzymes protéolytiques pour, respectivement, dissoudre les minéraux et dégrader les protéines de la matrice osseuse (Feng and Teitelbaum, 2013).

Les cellules de Kupffer représentent les macrophages hépatiques, présents dans le revêtement sinusoidal (Dixon et al., 2013). Une des principales fonctions des cellules de Kupffer est l'élimination des agrégats protéiques, des globules rouges sénescents et des débris cellulaires circulaires (Willekens et al., 2005). Elles participent également à la surveillance immunitaire face aux antigènes alimentaires et aux pathogènes issus de la flore intestinale puisque le foie reçoit 75 % de son apport sanguin de l'intestin via la veine porte (Lapierre and Alvarez, 2007). Les cellules de Kupffer représentent le pool de macrophages le plus abondant de l'organisme et participent donc à l'homéostasie en protégeant l'hôte et ont la capacité de déclencher des réponses immunogènes ou tolérogènes par la production d'IL-10 et de PGE₂ et une expression faible des molécules de costimulation et du CMH-II (Crispe, 2011; You et al., 2015). Les cellules de Kupffer participent également au métabolisme hépatique : ils expriment les gènes impliqués dans le métabolisme du fer (l'absorption, le traitement et l'exportation du fer) contrôlé par les facteurs de transcription SPI-C et NRF2 (Scott and Williams, 2018). Ils participent également au métabolisme lipidique par une expression élevée des facteurs de transcription « Liver X Receptors » (LXR) et « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor » (PPAR). Ces facteurs de transcription sont impliqués dans l'expression des gènes ABCA1 et ABCG1 codant pour des transporteurs d'efflux des HDL transportés aux hépatocytes (Hong and Tontonoz, 2008; Scott and Williams, 2018).

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle essentiel dans l'élimination des particules, des microbes, de la poussière et des polluants inhalés. Ils participent également à la régulation du renouvellement du surfactant qui est produit par les cellules épithéliales alvéolaires. En l'absence des macrophages alvéolaires, le surfactant s'accumule dans les alvéoles et compromet les fonctions pulmonaires (Gordon and Pluddemann, 2017).

Les macrophages cardiaques, présents dans le nœud atrioventriculaire, participent à l'homéostasie cardiaque. Ils expriment la connexine-43, impliquée dans les jonctions intercellulaires, qui permet d'augmenter le potentiel de membrane au repos des cardiomyocytes et accélère leur repolarisation. Une étude récente a montré que la déplétion de ces macrophages conduit à une réduction de la

conduction auriculo-ventriculaire, amenant un défaut de transmission électrique entre les oreillettes et les ventricules du cœur (Silvestre and Vandecasteele, 2018).

Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du système nerveux central (SNC). Ils représentent une population unique de cellules myéloïdes de par son origine (cf ontogénie des macrophages) et ses fonctions. L'IL-34, constitutivement produite dans le cerveau, permet la survie et la différenciation des cellules microgliales. Comme ses homologues périphériques, elles participent à l'élimination des pathogènes et favorisent la réparation tissulaire. Cependant, elles participent aussi à la régulation du développement embryonnaire et la régulation physiologique des réseaux neuronaux et synaptiques chez l'adulte. Contrairement aux premières idées, les cellules microgliales sont très dynamiques ; des études ont notamment montré, dans des souris dont les cellules microgliales exprimaient la GFP, les déplacements continus des prolongements de la microglie dans le néocortex (plusieurs micromètres par minutes) (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Leur rôle dans l'homéostasie cérébrale passe par le maintien des gradients ioniques qui permettent la propagation des potentiels d'actions entre les neurones mais aussi en captant les neurotransmetteurs libérés en excès (Kettenmann et al., 2011). En cas de lésion axonique, les microglies activées peuvent se positionner sur le corps cellulaire du neurone lésé et éliminer les terminaisons synaptiques inutiles dans le rétablissement du réseau neuronal (Blinzinger and Kreutzberg, 1968; Trapp et al., 2007) ; ce processus est appelé « synaptic stripping » (Kettenmann et al., 2013).

2. *Dichotomie M1-M2*

Les macrophages présentent de nombreuses fonctions qui sont constamment adaptées à la nature des signaux présents dans leur environnement. Il est donc possible d'imaginer qu'il existe une multitude de combinaisons de signaux donnant naissance à autant de phénotypes différents (Xue et al., 2014). Toutes ces facettes, illustrant la diversité des macrophages, rend toute classification très complexe. Néanmoins, afin de faciliter la compréhension de leur biologie, une classification a été proposée au début des années 2000, sur le modèle de la polarisation lymphocytaire Th1/Th2, opposant les macrophages M1 dits inflammatoires (ou classiquement activés) aux macrophages M2 immunosuppresseurs (ou macrophages activés de façon alternative) (Mantovani et al., 2002) (Figure 6A). Cette classification s'est ensuite affinée, notamment pour les macrophages M2 avec la définition de 3 sous-classes, M2a, M2b et M2c (Mantovani et al., 2004b) (Figure 7). Enfin, en 2008, cette classification fut actualisée en prenant en compte le continuum d'états fonctionnels avec trois sous-populations de macrophages : les macrophages activés par la voie classique (en référence aux

macrophages M1 inflammatoires), les macrophages immunorégulateurs et les macrophages réparateurs (Mosser and Edwards, 2008) (Figure 6B).

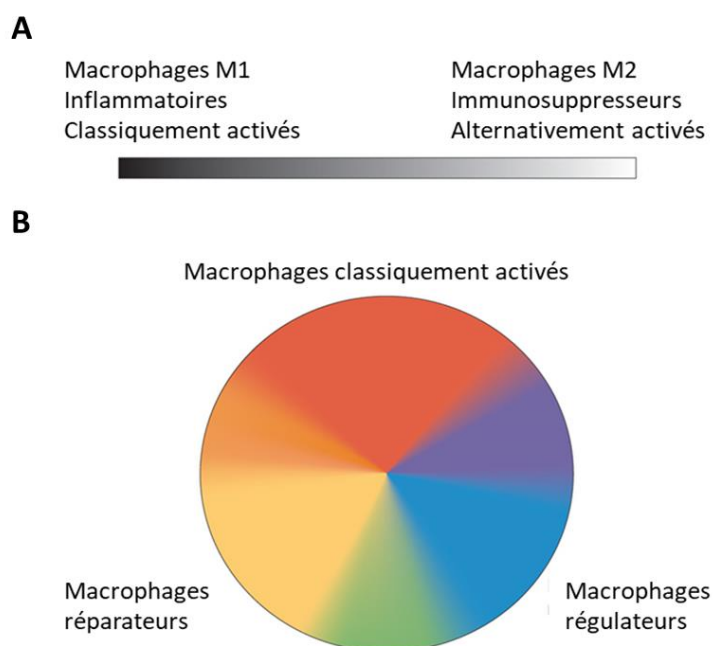


Figure 6 : La classification des macrophages. Au début des années 2000, une classification des macrophages est proposée sur la base de la classification lymphocytaire Th1/Th2 (A) (Mantovani et al., 2002), elle oppose les macrophages M1 aux macrophages M2, autrement dit les macrophages aux propriétés inflammatoires résultant d’une activation classique (IFN γ ou LPS) aux macrophages ayant des propriétés immunosuppressives à la suite d’une activation alternative (IL-4). En 2008, une étude propose une évolution de la classification des macrophages en 3 dimensions (B) (Mosser and Edwards, 2008). Elle met en évidence les nombreux profils macrophagiques par l’utilisation d’un nuancier de couleurs évoluant autour de 3 pôles représentant 3 catégories : les macrophages classiquement activés, les macrophages réparateurs et les macrophages régulateurs. Figure adaptée de (Mosser and Edwards, 2008).

a. Les macrophages de type M1

Les macrophages M1 sont inflammatoires et microbicides. Ils sont générés en présence de GM-CSF qui est sur-exprimée en cas d’inflammation (Jeannin et al., 2018). Le profil inflammatoire peut être accentué en présence d’IFN- γ et révélé après une stimulation par des endotoxines ou autre PAMP (Mantovani et al., 2002) (Figure 7). Ils expriment et sécrètent, après activation, de nombreux médiateurs inflammatoires. Ils expriment fortement le CMH-II, ainsi que les molécules de costimulation, CD80 et CD86 (Mantovani et al., 2002). Les macrophages M1 favorisent la génération de lymphocytes Th1, notamment en favorisant leur recrutement (production de CXCL10) et leur

activation (via la synthèse d'IL-12). La synthèse d'IL-1 et d'IL-23 par les macrophages M1, induit la génération de lymphocytes Th17. Les M1 sécrètent également les cytokines IL-1- β , IL-6, TNF α et de nombreuses chimiokines, telles que l'IL-8 et peu de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF β). Ils sécrètent également des molécules microbicides telles que des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde (O $_2^{\cdot-}$) ou le peroxyde d'hydrogène H $_2$ O $_2$ (Martinez et al., 2006; Tan et al., 2016).

D'un point de vue métabolique, les macrophages M1 ont un profil à dominante glycolytique, l'utilisation du glucose comme source énergétique conduisant à la réduction du pyruvate en lactate et son export hors de la cellule (Geeraerts et al., 2017). Ce profil est médié par le facteur de transcription HIF1- α qui augmente l'expression de nombreux gènes codant pour des acteurs de la glycolyse, tels que l'enzyme « Lactate dehydrogenase A » (LDHA) et le transporteur « Glucose Transporter 1 » (GLUT1) qui contrôlent, respectivement, la formation de lactate et la capture de glucose (Jung et al., 2019). La glycolyse permet la synthèse des cytokines pro-inflammatoires mais aussi l'utilisation de la voie des pentoses phosphates afin de générer le NADPH, co-facteur pour la production du NO. Les M1 sollicitent aussi les voies de la synthèse d'acide gras et de l'arginine, intervenant dans la formation du NO.

Des études chez la souris ont confirmé que, malgré un métabolisme majoritairement glycolytique, le métabolisme oxydatif était aussi associé au profil M1 faisant de la mitochondrie une organelle indispensable à leur génération. Tout d'abord, les M1 murins présentent une accumulation du citrate et du succinate, dû à deux cassures au sein du cycle de Krebs et qui participent à la stabilisation du facteur de transcription HIF1- α et à l'acquisition de propriétés inflammatoires et microbicides (Diskin and Palsson-McDermott, 2018; O'Neill and Pearce, 2016). Il apparaît aussi que la présence de bactéries vivantes conduit à une réorganisation de la structure des complexes formant la chaîne respiratoire mitochondriale et dont l'activité du complexe II est responsable d'une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (Garaude et al., 2016). De plus, une stimulation au LPS provoque un transport inverse des électrons au sein de la chaîne respiratoire, conduisant à la synthèse de ROS qui favorisent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Mills et al., 2016). A noter qu'une étude réalisée sur des macrophages humains générés en présence de GM-CSF, montre que les macrophages M1 ont un profil énergétique majoritairement glycolytique et que l'utilisation d'inhibiteurs de la glycolyse inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Izquierdo et al., 2015).

b. Les macrophages de type M2

Les macrophages de type M2 sont généralement caractérisés par une faible production de cytokines pro-inflammatoires et d'IL-12, une expression élevée d'IL-10 et une forte activité phagocytaire. D'un point de vue « historique », 3 sous population de macrophages M2 (M2a-c) ont été décrites (Mantovani et al., 2004b). Actuellement, les nouvelles sous-populations de M2 décrites sont regroupées sous la terminologie M2-like (Murray et al., 2014) (Figure 7).

Les macrophages M2a, générés en présence d'IL-4 et d'IL-13, sont caractérisés par l'expression du récepteur au mannose et des SR et sécrètent les chimiokines CCL24, CCL22, CCL17 et CCL18. Ils sont impliqués dans les réponses de type Th2.

Les macrophages M2b sont obtenus par exposition de monocytes à des complexes immuns (IC) en présence d'un ligand des TLR ou de l'IL-1 récepteur. Ils ont la particularité d'exprimer des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) et des taux élevés d'IL-10. Ils sont impliqués dans l'immunorégulation.

Les macrophages M2c sont générés en présence d'IL-10 ; ils expriment des récepteurs au mannose et sécrètent des taux élevés d'IL-10, de TGF- β et de PTX3 et sont impliqués dans le remodelage tissulaire.

A noter également les macrophages générés en présence des ligands du CD115, de M-CSF ou d'IL-34 qui complètent la liste des macrophages M2 au titre des macrophages M2-like. Ces macrophages présentent une forte sécrétion d'IL-10 et une faible sécrétion d'IL-12, une expression de SR, dont CD163, élevée (Foucher et al., 2013).

Les macrophages M2 présentent un profil métabolique majoritairement oxydatif (Pearce and Pearce, 2013). De nombreuses études réalisées avec des macrophages générés en présence du facteur de polarisation IL-4 montrent que les mitochondries sont essentielles dans la différenciation des macrophages M2 (Benmoussa et al., 2018; Diskin and Palsson-McDermott, 2018). L'IL-4 induit une biogénèse mitochondriale, supportant un métabolisme oxydatif via PGC-1 β et STAT6, inhibant la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (Vats et al., 2006). Ainsi, les voies permettant d'alimenter le cycle de Krebs sont sollicitées, telles que l'oxydation de la glutamine générant de l' α -cétoglutarate et la β -oxydation des acides gras afin de former de l'acétyl-CoenzymeA (CoA) (Geeraerts et al., 2017). Par ailleurs, une étude a remis en cause l'utilisation de la β -oxydation des acides gras dans l'acquisition d'un phénotype M2 en présence d'IL-4 ; en effet, l'inhibition des transporteurs des acides

gras mitochondriaux, empêchant leur oxydation, n’inhibe pas l’acquisition des marqueurs M2 (Divakaruni et al., 2018). Le métabolisme oxydatif agit également sur l’expression des marqueurs induits par l’IL-4. En favorisant l’oxydation de la glutamine, l’IL-4 induit la formation d’ α -cétoglutarate qui joue un rôle épigénique en soutenant l’activité des histones déméthylase, JMJD. Celles-ci favorisent la déméthylation des histones, levant la répression des gènes codant pour des marqueurs M2 (Liu et al., 2017). Enfin, il apparaît également que le réseau mitochondrial intervient dans l’efferocytose. Premièrement, la clairance des cellules mortes et la sécrétion d’IL-10 nécessitent l’oxydation des acides gras et la respiration oxydative mitochondriale (Zhang et al., 2019). Deuxièmement, l’efferocytose requiert une fission des mitochondries, permettant la formation de phagosomes par la libération de calcium dans le cytoplasme (Wang et al., 2017).

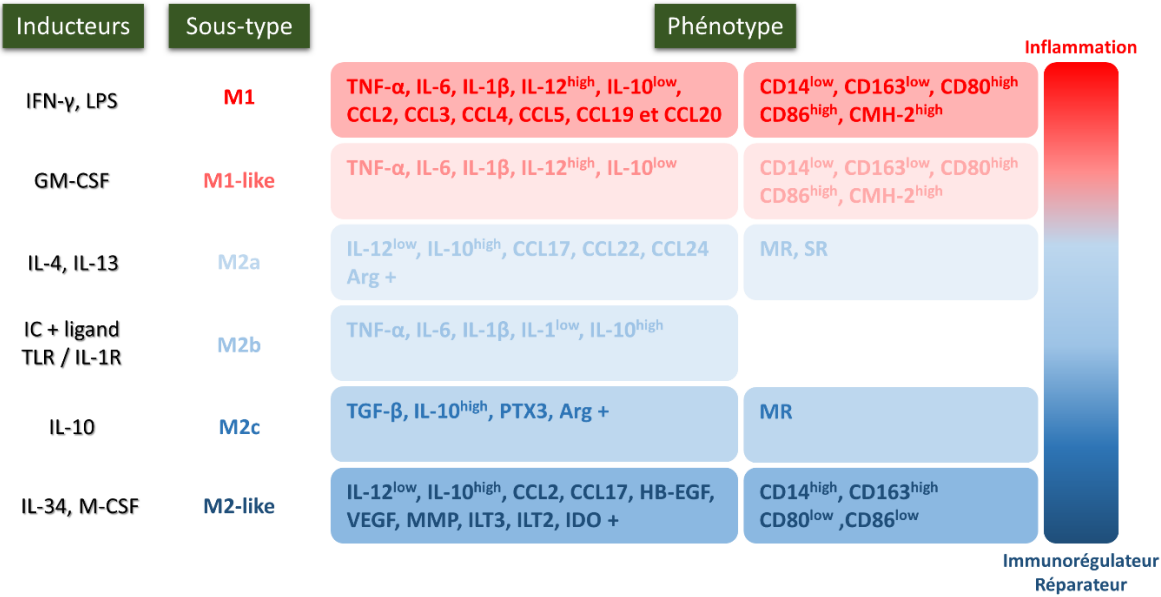


Figure 7 : Les différentes sous-populations de macrophages humains, leurs phénotypes et leurs rôles dans l’inflammation. Une classification en deux dimensions oppose les macrophages M1 et M1-like au macrophages M2a, M2b, M2c et M2-like. Chaque sous-population est générée en présence de différents inducteurs à l’origine d’un phénotype défini par l’expression de différents marqueurs s’inscrivant dans un continuum allant de l’inflammation à l’immunorégulation ou la réparation tissulaire. Figure élaborée d’après (Mantovani et al., 2004b).

Il est important de noter que malgré les nombreux rôles et une grande diversité phénotypiques à propos des macrophages humains et murins, il y a cependant des divergences entre ces deux espèces.

c. Différences Homme – Souris sur la biologie des macrophages

Il existe de nombreuses différences entre les macrophages de souris et humains, que ce soit en terme d’origine ou en terme de biologie (facteurs de survie/différenciation, phénotype et

métabolisme). Ces différences peuvent en partie s'expliquer par les sources dont on dispose pour les étudier. L'origine des macrophages présente des disparités entre les deux espèces, chez l'Homme, les macrophages peuvent provenir soit, (i) de macrophages isolés à partir de tissus de patients ou (ii) générés à partir de monocytes du sang circulant de sujet sains. Chez la souris, les macrophages sont issus soit (i) de macrophages murins isolés de tissus ou (ii) générés à partir de monocytes issus de la moelle osseuse (Figure 8). Les nombreuses différences phénotypiques, métaboliques et fonctionnelles entre les macrophages murins et humains rendant la transposition des résultats d'une espèce à une autre difficile, ont pu conduire à une confusion sur leur biologie (Tableau 2).

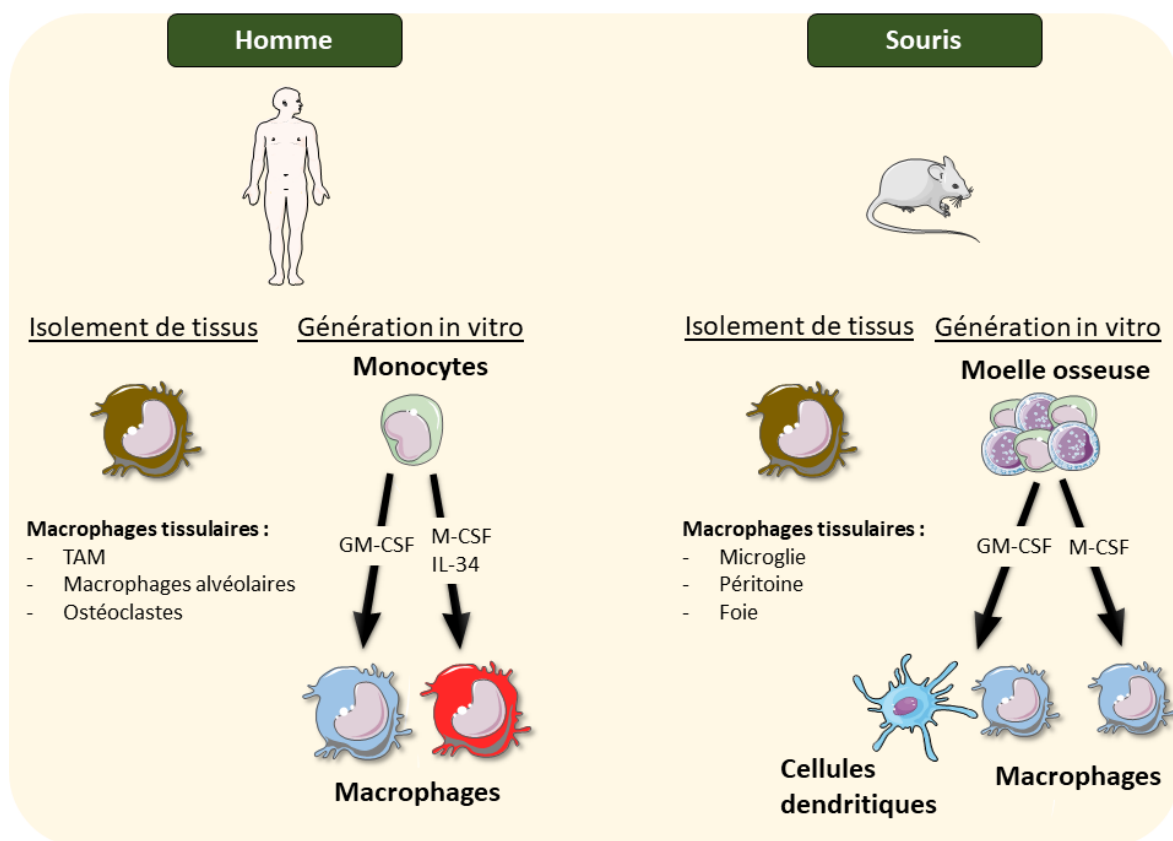


Figure 8 : Origine des macrophages humains et murins, tissulaires ou générés in vitro. Chez l'Homme, les macrophages tissulaires sont isolés essentiellement de patients, à la suite de biopsies ou d'exérèses. La génération in vitro de macrophages se réalise à partir de monocytes du sang périphérique de sujets sains ou de patients en présence de facteurs de survie et de différenciation, GM-CSF pour les macrophages inflammatoires et M-CSF et/ou IL-34 pour les macrophages immunorégulateur/réparateurs. Chez la souris, des macrophages tissulaires peuvent être isolés des tissus. Les macrophages peuvent être générés in vitro à partir de monocytes isolés de la moelle osseuse et leur différenciation en présence de M-CSF et du facteur de polarisation. GM-CSF induit une population hétérogène exprimant des marqueurs macrophagiques et de cellules dendritiques.

Tout d'abord, concernant la génération des macrophages à partir de monocytes : alors que, chez l'Homme, les facteurs de différenciation sont le GM-CSF, le M-CSF et l'IL-34 (Jeannin et al., 2018), seul le M-CSF induit la différenciation de monocytes en macrophages chez la souris (Lacey et al., 2012). Le GM-CSF permet la différenciation des monocytes murins en une population hétérogène assimilée aux DC exprimant toutefois certains marqueurs de macrophages (Fleetwood et al., 2007; Helft et al., 2015). De plus, certains facteurs de polarisation n'ont pas les mêmes conséquences sur le phénotype des macrophages humains et murins. Ainsi, le LPS permet de révéler le phénotype des macrophages humains alors qu'il induit la génération de macrophages de type inflammatoire chez la souris.

D'un point de vue métabolique, de nombreuses études mettent en évidence que les macrophages inflammatoires présentent un cycle de Krebs rompu à deux endroits, après le citrate et le succinate, entraînant leur accumulation, la synthèse de cytokines pro-inflammatoire et inhibant l'utilisation de la chaîne respiratoire (Kelly and O'Neill, 2015; O'Neill et al., 2016). Ces données ont été obtenues avec des macrophages murins issus de cellules de la moelle osseuse (Jha et al., 2015; Tannahill et al., 2013). Alors que peu d'études confirment ces données dans les macrophages humains, il a été montré que les macrophages inflammatoires humains sollicitent la chaîne respiratoire (Izquierdo et al., 2015). Une étude récente, mettant en avant la comparaison de macrophages humains et murins, a mis en évidence que les macrophages inflammatoires provenant de la souris présentent une réduction marquée de l'utilisation de la chaîne respiratoire comparativement à ceux provenant de l'Homme (Vijayan et al., 2019). Cependant, le protocole expérimental de cette publication permettant ces observations sont critiquables, pointant les erreurs possibles sur l'étude des macrophages humains et murins. En effet, pour générer des macrophages inflammatoires, les auteurs ont utilisé pour les deux populations de macrophages, murins et humains, du M-CSF en guise de facteur de différenciation puis du LPS en tant que facteur de polarisation. D'un point de vue phénotypique, les macrophages humains générés en M-CSF et exposés au LPS ne les orientent pas vers un phénotype inflammatoire mais immunorégulateur (Foucher et al., 2013). D'autre part, les macrophages inflammatoires murins produisent du NO (Padgett and Pruett, 1992; Schneemann et al., 1993), à l'inverse les macrophages humains ne produisent pas de NO lors d'une activation par un ligand des TLR et IFN- γ (Murray and Wynn, 2011). Il existe également une différence pour les macrophages immunorégulateurs murins et humains. L'enzyme Arg1 est fréquemment utilisée comme marqueur des macrophages immunorégulateurs murins. L'Arg1 intervient dans le métabolisme de l'arginine pour former de l'urée et de l'ornithine à l'origine de la synthèse de la proline et des polyamines qui interviennent dans la réparation tissulaire (Martinez et al., 2008; Shearer et al., 1997). L'Arg1 rentre

en compétition avec l'enzyme NOS pour l'arginine, expliquant son activité diminuée. Cependant, Arg1 est absente dans les macrophages immunorégulateurs humains générés à partir de monocytes (Preisser et al., 2014).

Enfin, d'un point de vue phénotypique, de nombreux marqueurs de macrophages sont présents chez la souris et absents chez l'Homme comme par exemple Ym1 (Raes et al., 2005). De même, le marqueur F4/80 (EMR1), couramment utilisé chez la souris, n'est pas exprimé par les monocytes et les macrophages humains (Hamann et al., 2007). En revanche, TGM2 est un marqueur de macrophages réparateurs et immunorégulateurs commun à l'Homme et à la souris (Martinez et al., 2013).

Tableau 2 : Phénotype des macrophages issus de l’Homme et de la souris.

	Homme		souris	
Facteurs de différenciation	M-CSF, GM-CSF, IL-34		M-CSF	
Marqueurs	CD14, CD11b, CD68		CD11b, F4/80 (Emr1)	
Facteurs de polarisation	<u>Macrophages inflammatoires:</u> IFN- γ	<u>Macrophages réparateurs / immunorégulateurs:</u> IL-10, IL-14, IL-13, GC, IC	<u>Macrophages inflammatoires:</u> LPS, IFN- γ	<u>Macrophages réparateurs / immunorégulateurs:</u> IL-4, IL13,
Phénotype associé	IL-12 ^{high} , IL-10 ^{low} CD14 ^{int} , CD163 ^{low} IL-1 β , IL-6, TNF α	IL-12 ^{low} IL-10 ^{high} CD14 ^{high} CD163 ^{high} TGM2,Facteurs trophiques	IL-1 β , IL-6, TNF α	Ym1, CCL24, CCL12, Mrc1, TGM2
Métabolisme	Glycolytiques	Oxydatifs	NOS, NO Cycle de Krebs incomplet Glycolytiques	Arg1 Cycle de Krebs complet Oxydatifs

iii. Rôles pathologiques des macrophages

Comme évoqué précédemment, les propriétés des macrophages leur permettent de réaliser de nombreuses fonctions indispensables à l’homéostasie tissulaire lorsque les différents paramètres de mise en place, et de résolution sont optimaux. Cependant, dans certains contextes, le rôle des macrophages se révèle délétère et ils peuvent participer aux processus physiopathologiques de maladies sévères, comme le cancer et les maladies inflammatoires chroniques.

1. Cancer

Les cellules immunitaires, et en particulier les macrophages qui représentent l’infiltrat immunitaire majoritaire dans les tumeurs, ont un rôle majeur dans la tumorigénèse (Mantovani et al., 2017) (Figure 9). L’accumulation des macrophages, appelés « Tumor-Associated Macrophages » (TAM), sont, dans la majorité des cas, associés à un mauvais pronostic (Gentles et al., 2015; Zhang et al., 2012). Le profil des TAM et leur origine sont dépendants de la localisation et du stade de la tumeur. Certaines tumeurs, comme les gliomes, présentent un infiltrat de monocytes mais aussi des TAM dérivés de la microglie (Bowman et al., 2016; Lapenna et al., 2018), néanmoins, pour la majorité des tumeurs, il existe un consensus pour dire que les TAM ont pour origine des monocytes recrutés dans la tumeur (Mantovani et al., 2017). Le recrutement des monocytes est induit par des chimiokines comme CCL2 (Ramanathan and Jagannathan, 2014) ou CCL5 (Walens et al., 2019) produites par les cellules stromales et tumorales, mais également par des cytokines comme le M-CSF (Dwyer et al.,

2017) ou le VEGF (Riabov et al., 2014). La différenciation des monocytes en TAM est induite par les facteurs présents localement et dont la nature diffère au cours de la progression tumorale. A l'image de la théorie des trois E (Dunn et al., 2004), dans les premiers stades de la tumeur, le recrutement des cellules immunitaires permet « l'Élimination » des cellules tumorales ; cette phase implique des macrophages M1 (Lin et al., 2017). Puis, au cours des phases « d'Équilibre et d'Échappement », les TAM favorisent l'immunorégulation, la croissance tumorale et le processus métastatique du fait de leurs propriétés de réparation tissulaire (sécrétion de nombreux facteurs trophiques) et immunorégulatrices (Chanmee et al., 2014; Mantovani et al., 2017). La présence de M-CSF ainsi que de nombreux métabolites, comme l'acide lactique retrouvés localement dans de nombreuses tumeurs (Chambers, 2009; Koh et al., 2014; Sun et al., 2017; Yang et al., 2015), favorisent l'acquisition de marqueurs de type M2 par les TAM (Colegio et al., 2014; Duluc et al., 2007). La sécrétion de facteurs de croissance, tels que VEGF, HB-EGF et OSM (Lauber et al., 2015; Riabov et al., 2014; Vlaicu et al., 2013) et des MMP (Erreni et al., 2011) favorisent la croissance tumorale, l'angiogénèse et le processus métastatique (Mantovani et al., 2017). La sécrétion d'IL-10 favorise l'induction de lymphocytes Treg et prévient l'activité des LT effecteurs et la sécrétion de TGF- β inhibe la production d'IL-2 (Saraiva and O'Garra, 2010; Travis and Sheppard, 2014). De plus, les TAM peuvent aussi inhiber l'activité des LT en exprimant des molécules coinhibitrices comme PD-L1 et PD-L2 (Mantovani and Allavena, 2015). La sécrétion des chimiokines CCL17 et CCL22 permet le recrutement de lymphocytes Treg et les chimiokines CCL18 et CCL24 attirent les lymphocytes T naïfs qui se différencient, localement, en lymphocytes Treg (Mantovani et al., 2004a; Mantovani et al., 2004b).

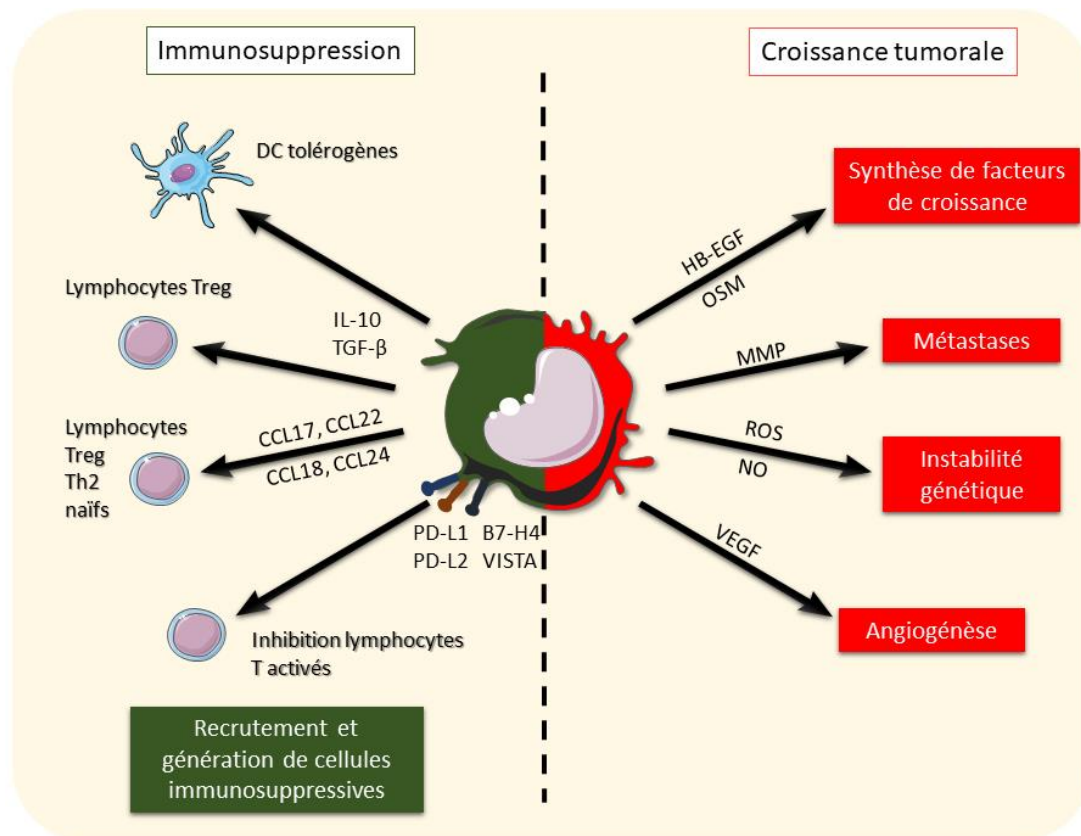


Figure 9 : Rôles des TAM dans la tumorigénèse. Les TAM au sein du microenvironnement tumoral ont divers rôles permettant la génération et le recrutement de cellules immunitaires immunorégulatrices et inhibant les fonctions des cellules effectrices. Ils favorisent également la migration, l'invasion, la croissance tumorales via la sécrétion de facteurs trophiques et des métalloprotéases. Figure adaptée de (Mantovani et al., 2017).

2. Maladies Inflammatoires chroniques

De par leurs propriétés inflammatoires, un état d'activation prolongé des macrophages est retrouvé dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques (Ponzoni et al., 2018)).

a. L'asthme

Les macrophages alvéolaires ont une expression augmentée de CCL7 et CCL2 qui favorise le recrutement de monocytes (Lee et al., 2015). Ils présentent un défaut de phagocytose et d'efferocytose, conduisant à une accumulation de bactéries, tels que *Haemophilus influenzae* ou *Staphylococcus aureus* (Liang et al., 2014; Simpson et al., 2016) et de DAMP (Hou et al., 2011). L'accumulation des DAMP et PAMP résulte en une augmentation, chez les patients asthmatiques, de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1-β, IL-6 et IL-8) dans les tissus des voies respiratoires (Ackerman et al., 1994; Fricker and Gibson, 2017). Ce processus inflammatoire est également

entretenu avec une diminution de la sécrétion d'IL-10 par les macrophages alvéolaires (Lim et al., 2004).

b. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par le rétrécissement et l'épaississement des artères dû à la formation de plaques d'athérome, induites par une accumulation de lipides, de glucides et de tissus adipeux autour de la paroi artérielle. Les macrophages participent à tous les stades de la maladie (Moore et al., 2013). Les monocytes sont recrutés via CCL2 au cœur des plaques (Tacke et al., 2007) et, après leur différenciation en macrophages, participent à la phagocytose des lipoprotéines. Les macrophages ayant accumulé de grandes quantités de lipoprotéines présentent un profil particulier ; ils sont appelés macrophages spumeux (Foam Cells) (Yu et al., 2013). Ces macrophages empêchent initialement la formation des plaques mais l'accumulation excessive de lipides, responsable de la formation de gouttelettes lipidiques intracellulaires, compromettant leurs propriétés. La phagocytose lipidique induit l'expression de facteurs tels que netrin-1 qui inhibe la migration des macrophages et les retient dans les plaques. Au sein des plaques avancées, les macrophages sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires : des chimiokines (CCL2, CCL5), des cytokines (TNF α , IL-1- β et IL-6), des agents microbicides ainsi que des protéases dégradant la matrice (Düwell et al., 2010; Stewart et al., 2010). Enfin, la mort massive des macrophages par apoptose ou nécrose dans les plaques d'athérome entraîne une libération de leur contenu lipidique et des DAMP, ce qui conduit à la formation d'un noyau nécrotique pro-thrombotique (Moore et al., 2013; Tabas, 2005). Ce noyau nécrotique est un composant clé des plaques instables et contribue à leurs ruptures et à la formation de caillots sanguins intravasculaires (Gonzalez and Trigatti, 2017).

c. La polyarthrite rhumatoïde

Dans la polyarthrite rhumatoïde, une maladie auto-immune courante caractérisée par une arthrite chronique qui entraîne la destruction articulaire, les macrophages jouent un rôle de premier plan dans la progression de la maladie (Kinne et al., 2000). Il est décrit qu'un nombre accru de macrophages au sein de la membrane synoviale est l'une des premières caractéristiques de la maladie. De plus, l'accumulation synoviale des macrophages, qui intervient suite à un recrutement massif de monocytes, est strictement liée à l'érosion articulaire (Udalova et al., 2016). Les macrophages représentent la source principale de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1- β et IL-6) et de chimiokines (CCL2 et CXCL8) contribuant au recrutement de neutrophiles et de monocytes

conduisant à une inflammation chronique (Andreaskos et al., 2004). Ils sécrètent des MMP mais aussi du TNF α qui participe à la destruction des tissus (Saklatvala, 1986). La destruction est également favorisée par les macrophages résidents, les ostéoclastes et le recrutement de monocytes qui se différencient en ostéoclastes sous l'action de RANK-L produit localement, notamment par les fibroblastes (Takayanagi et al., 2000).

Des études ont fait un rapprochement entre les patients ayant une polyarthrite rhumatoïde et le risque de développer une maladie cardiovasculaire, avec notamment une accélération de l'athérosclérose liée à une polyarthrite rhumatoïde (Houry Levi et al., 2016). D'un point de vue cellulaire, il existe des similarités entre les macrophages issus de ces deux pathologies. Outre des profils pro-inflammatoires similaires, les macrophages issus de patients ayant une polyarthrite rhumatoïde et ceux ayant une maladie coronarienne comme l'athérosclérose présentent un métabolisme similaire. Ce métabolisme est caractérisé par une glycolyse accrue avec une surexpression des GLUT, des enzymes de la glycolyse (comme PKM2 et HK2) et une capacité de production d'ATP supérieure comparativement à des macrophages de sujets sains (Siouti and Andreaskos, 2019; Zeisbrich et al., 2018).

3. Ciblage thérapeutique des macrophages

Du fait de leur rôle dans de nombreuses pathologies chroniques, les macrophages représentent des cibles thérapeutiques. Différentes approches sont mises en œuvre comme la « reprogrammation » ou la déplétion des macrophages (Tableau 3). À terme, l'objectif recherché est de bloquer leurs propriétés afin d'empêcher la propagation de la pathologie. Par exemple, le rôle central que joue le TNF α , produit majoritairement par les macrophages, dans la réponse inflammatoire a conduit au développement de récepteurs solubles et d'anticorps monoclonaux humanisés contre le TNF α pour traiter les maladies inflammatoires (Feldmann and Maini, 2001; McInnes and Schett, 2017; Tam et al., 2014; Ursini et al., 2017). Cette stratégie a démontré avoir des effets sur le recrutement, la délétion ou la reprogrammation des macrophages dans les maladies inflammatoires (Tableau 3).

Tableau 3 : Stratégies thérapeutiques visant les macrophages dans un contexte de pathologie chronique (cancer ou inflammation).

Fonctions ciblées	Agent thérapeutique	Type de pathologie	Références
Recrutement	Ac anti-CSF1	Cancer du sein	(Mantovani et al., 2017)
	Ac anti-CCL2	Cancer de l’ovaire, cancer de la prostate	(Brana et al., 2015; Moisan et al., 2014)
	Anti-TNF α	Polyarthrite rhumatoïde, Athérosclérose	(Feldmann and Maini, 2001; Taylor et al., 2000)
Délétion		Polyarthrite rhumatoïde	(Catrina et al., 2005; Taylor et al., 2000)
Reprogrammation		Asthme	(Berry et al., 2006; Brightling et al., 2008)
Délétion	Biphosphonates	cancer des os	(Van Acker et al., 2016)
Reprogrammation	IFN- γ	Cancer de l’ovaire	(Duluc et al., 2009; Ries et al., 2014)
	Ac anti-IL-6R	Polyarthrite rhumatoïde	(Obeng et al., 2016)
	Statins	Athérosclérose	(Hofnagel et al., 2007)

c. Les corps cétoniques

Comme évoqué ci-dessus, la polarisation fonctionnelle des macrophages est conditionnée par la nature des signaux reçus localement. Ces signaux sont d’origine très diverses. Jusqu’à présent, la majorité des études se sont focalisées sur les médiateurs immunologiques. Des études récentes ont cependant souligné le rôle des médiateurs/signaux non immunologiques, et en particulier ceux liées au métabolisme, tels que les nutriments, l’oxygène, le pH extracellulaire ainsi que de nombreux métabolites.

Dans cette troisième partie, nous présenterons une famille de métabolites, les corps cétoniques, qui ont servi de fil conducteur à ce sujet de thèse.

i. Généralités

Les cellules effectuent constamment des milliers de réactions chimiques nécessaires pour garder la cellule, les tissus et l’organisme en vie et en bonne santé. Toutes les réactions chimiques qui ont lieu à l’intérieur d’une cellule sont collectivement appelées métabolisme cellulaire.

Chez les mammifères, le foie joue un rôle fondamental dans le métabolisme en orchestrant les signaux métaboliques et les substrats énergétiques en provenance ou destinés aux tissus

périphériques (Rojas-Morales et al., 2016). L'adaptation métabolique au jeûne prolongé chez l'homme repose à la fois sur la coordination des réponses des organes vitaux, principalement le foie, le cerveau, les reins et les muscles, et sur l'apport en substrat énergétique au niveau cellulaire. A l'état nourri, les cellules dépendent principalement du métabolisme du glucose. Quand le taux de glucose sanguin chute (lors d'une privation de nourriture), le foie génère du glucose à partir du glycogène stocké dans le foie et dans les muscles. Malgré cela, si le taux de glucose sanguin reste faible, le peu de glucose disponible est utilisé prioritairement par les neurones, mais aussi par les érythrocytes et les cellules proliférantes de la moelle osseuse et celles impliquées dans la régénération tissulaire. Le foie synthétise alors d'autres substrats énergétiques pour les tissus extra-hépatiques. Le changement le plus important dans le métabolisme systémique pendant le jeûne est déclenché par le glucagon et implique la mobilisation des lipides stockés dans le tissu adipeux et la libération, à partir des triglycérides, des acides gras libres et du glycérol. Ces deux composants sont, ensuite, catabolisés dans le foie : le glycérol est un substrat pour la synthèse du glucose par néoglucogénèse et les acides gras sont utilisés pour la synthèse des corps cétoniques (cétogénèse) (Grabacka et al., 2016).

ii. Synthèse et rôles des corps cétoniques

1. Définition/synthèse

Les corps cétoniques sont des molécules dérivant d'acides gras et représentent une source alternative de carburant métabolique lorsque le glucose est rare, comme cela est rencontré au cours de jeûne, de famine, de période néonatale, de période post-exercice, de grossesse et lors de régimes à faible teneur en glucides (Newman and Verdin, 2017). Le terme « corps cétoniques » définit trois molécules : (i) β -hydroxybutyrate (β -OHB), aussi appelé acide 3-hydroxybutyrique, (ii) son homologue déshydrogéné, l'acétoacétate (AcAc) et (iii) l'acétoacétate décarboxylé, ou acétone. L'acétone, produit en faible quantité par rapport aux autres corps cétoniques, est éliminé par l'expiration (Laffel, 1999; Musa-Veloso et al., 2002).

Le changement métabolique vers une cétogénèse, initié par des hormones dont le glucagon, nécessite une reprogrammation transcriptionnelle. Ceci afin d'assurer l'expression de l'ensemble des enzymes impliquées dans cette voie métabolique. PPAR α a un rôle central dans cette reprogrammation en permettant l'expression de la majorité des gènes nécessaire au transport des acides gras, leur oxydation mais aussi la synthèse des corps cétoniques (Grabacka et al., 2016). Les acides gras sont transportés à partir des adipocytes dans les mitochondries des hépatocytes via le

transporteur carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) (Figure 10). Après β -oxydation, deux molécules d'Acétyl-CoA sont condensées pour donner l'acétoacétyl-CoA par action de l'enzyme mitochondriale thiolase, aussi appelée l'acétyl-CoA C-acétyltransférase (ACAT). L'acétoacétyl-CoA est également condensée avec une molécule d'Acétyl-CoA pour former l'hydroxyméthylglutaryl (HMG)-CoA par l'enzyme 3-hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase (HMGCS2). L'hydroxyméthylglutaryl-CoA lyase (HMGCL) clive la molécule HMG-CoA pour libérer une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'AcAc (premier corps cétonique produit) ; cette dernière est ensuite réduite pour former une molécule de β -OHB (deuxième corps cétonique produit) par l'enzyme β -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH1) dont l'action nécessite une molécule de NADH. Cette réaction est réversible en fonction du rapport de concentration NAD/NADH présent dans les mitochondries des hépatocytes. Ainsi, le ratio AcAc / β -OHB est directement proportionnel au ratio NAD/NADH mitochondrial. Par ailleurs, l'AcAc peut aussi être décarboxylé spontanément pour former une molécule d'acétone (troisième et dernier corps cétonique produit) qui sera éliminé par la respiration. Les corps cétoniques sont exportés des cellules hépatiques par des transporteurs monocarboxylates (MCT1, MCT2 et MCT 7) et transportés aux tissus extra-hépatiques par voie sanguine (Figure 10) (Dhillon and Gupta, 2019; Hugo et al., 2012; Newman and Verdin, 2014a).

L'enzyme HMGCS2 est surtout exprimée dans les hépatocytes, faisant du foie le principal producteur des corps cétoniques. Néanmoins, la possibilité d'une cétogénèse extra-hépatique a été soulevée dans les cellules tumorales, les astrocytes, le rein, les cellules bêta pancréatiques, les muscles squelettiques et les cellules épithéliales car elles expriment HMGCS2 (Puchalska and Crawford, 2017; Puchalska et al., 2019). Chez l'homme, le taux sérique des corps cétoniques est régulé par l'insuline qui inhibe la lipolyse (β -oxydation des acides gras) et la cétogénèse (Paoli et al., 2013). Physiologiquement, les taux sériques des corps cétoniques sont généralement de quelques micromoles, et ce taux augmente à quelques centaines de micromoles après un jeûne de 12 h, puis de 1 à 2 mM après deux jours de jeûne et atteint 6 à 8 mM avec une famine prolongée et dans le cas de régimes à faible teneur en glucides (comme par exemple un régime cétogénique). Ce taux peut atteindre 20 mM dans certaines pathologies, telles que l'acidocétose diabétique (Newman and Verdin, 2014b; Newman and Verdin, 2017; Ruan and Crawford, 2018).

La molécule β -OHB représente la forme majoritaire des corps cétoniques produits par le foie (environ 70%), la part restante étant représentée par l'AcAc. Cependant, la proportion d'AcAc peut augmenter jusqu'à 50% de la totalité des corps cétoniques produits en fonction de la balance NAD/NADH mitochondrial hépatique impliquant l'enzyme BDH1 (Puchalska et al., 2019).

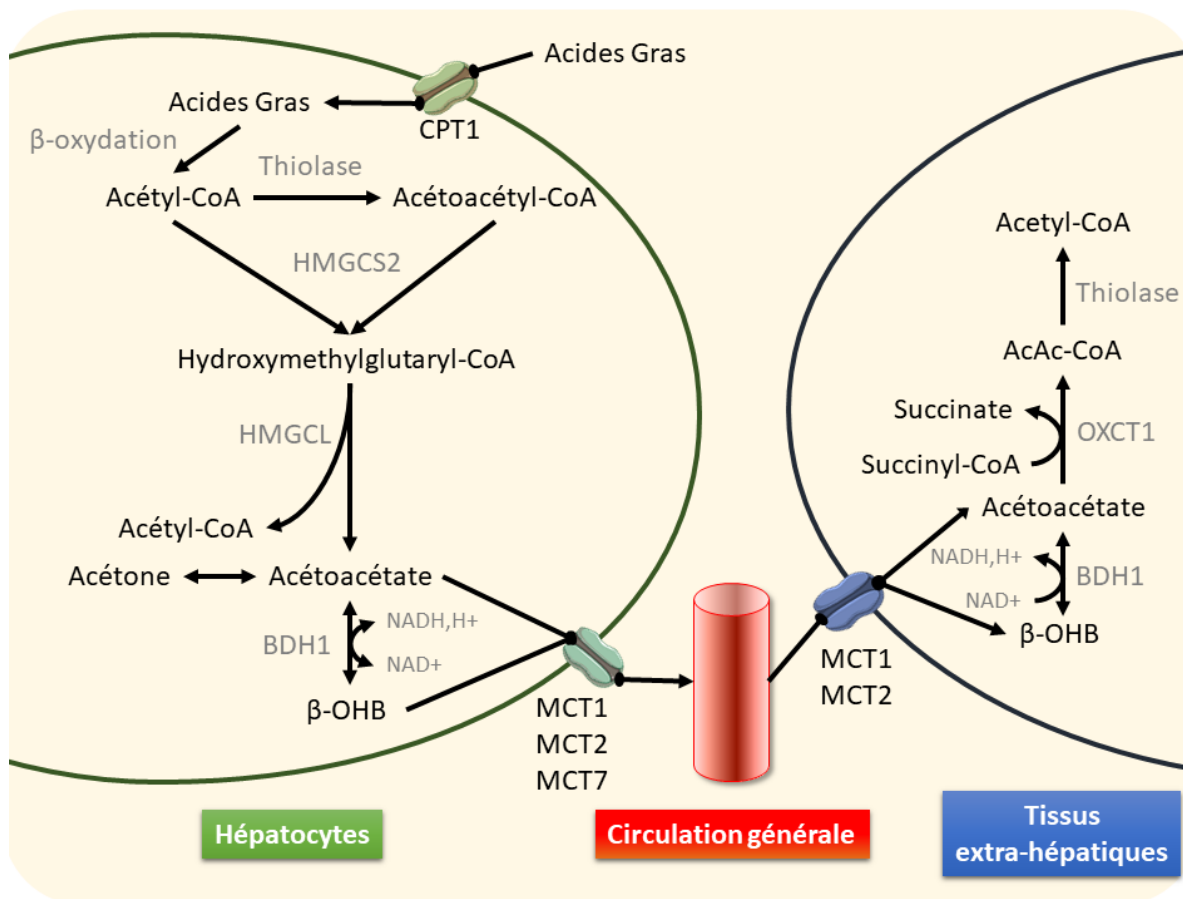


Figure 10: Synthèse et métabolisation des corps cétoniques. Résumé des voies conduisant à la formation des corps cétoniques dans les hépatocytes, leur libération dans la circulation générale et leur métabolisation dans les tissus extra-hépatiques. Figure adaptée de (Newman and Verdin, 2014a).

2. Rôles des corps cétoniques

a. Métabolite / substrat énergétique

Une fois synthétisés, les corps cétoniques sont transportés aux tissus extra-hépatiques pour subir une oxydation terminale fournissant l'énergie nécessaire pour les tissus extra-hépatiques (Dedkova and Blatter, 2014). Leur oxydation contribue au métabolisme énergétique global des mammifères.

Après capture via les MCT1 et MCT2, la molécule β -OHB est oxydée en acétoacétate grâce au NAD⁺ régénéré en abondance par la chaîne respiratoire mitochondriale via BDH1 (Figure 10). Dans les mitochondries, l'AcAc est le substrat de la 3-oxoacid CoA-transférase (ou SCOT pour succinyl-CoA-oxoacid transférase, codé par le gène *Oxct1*) qui transfère le coenzyme A du succinyl-CoA vers l'acétoacétate pour resynthétiser l'acétoacétyl-CoA. L'expression de SCOT est ubiquitaire, à

l'exception des hépatocytes, évitant ainsi l'oxydation des corps cétoniques par les cellules du foie (Puchalska and Crawford, 2017; Puchalska et al., 2019). Contrairement à d'autres voies métaboliques, telles que la glycolyse (avec l'enzyme hexokinase) et la dégradation des acides gras (avec l'enzyme acyl-CoA) qui demande une consommation d'énergie (ATP), l'oxydation des corps cétoniques (avec l'enzyme BDH1 ou SCOT) ne nécessite pas d'investissement d'ATP (Puchalska and Crawford, 2017).

Une réaction réversible par l'enzyme thiolase forme deux molécules d'acétyl-CoA à partir de l'acétoacétyl-CoA, alimentant le cycle de Krebs (Puchalska et al., 2019). A l'image de SCOT, BDH1 présente une expression sélective. Chez la souris, les macrophages ne présentent pas d'expression de BDH1 ; ainsi, l'utilisation des corps cétoniques comme substrat énergétique n'est possible qu'à partir de l'acétoacétate (Puchalska et al., 2019).

b. Molécule de signalisation

Longtemps vu comme un simple vecteur énergétique du foie vers les tissus extra-hépatiques, β -OHB peut également se comporter comme une molécule de signalisation, soit de manière directe (liaison à des récepteurs membranaires ou inhibition compétitive d'enzymes), soit de manière indirecte suite à son catabolisme en acétyl-CoA et ATP (Figure 11). Peu de données sont disponibles sur les propriétés de signalisation de l'acétoacétate, la plupart des informations évoquées ci-dessous concernent essentiellement le β -OHB.

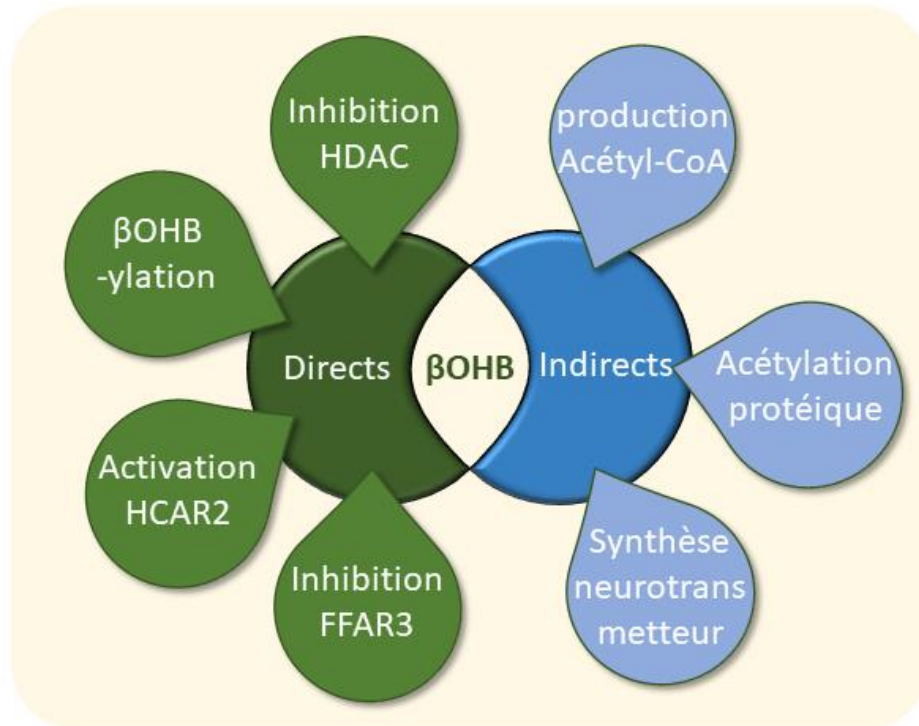


Figure 11 : Rôles directs et indirects du β -OHB. Résumé graphique des différents rôles décrit par le β -OHB. Ces rôles sont représentés sous deux catégories, les rôles directs avec l'inhibition des Histones Désacétylases de Classe I, la β -Hydroxybutyrylation des protéines et la liaison aux récepteurs FFAR3 et HCAR2. Les rôles indirects du β -OHB sont la synthèse de neurotransmetteur, l'augmentation du pool d'acétyl-CoA permettant l'acétylation protéiques. Figure adaptée de (Newman and Verdin, 2017).

i. Fonctions de signalisation directes

1. Inhibition des Histones Désacétylases

Les histones désacétylases (HDAC) représentent une famille de protéines, le plus souvent nucléaires, impliquées dans la régulation de l'expression génique en éliminant un groupe acétyl présent sur les résidus lysines des histones mais aussi sur des protéines non-histones telles que NF- κ B et MYC (Singh et al., 2010). La régulation de la transcription fait intervenir des modifications de l'état de compaction de l'ADN (Javaid and Choi, 2017). L'hyperacétylation des histones est le plus souvent associée à une expression génique car elle augmente l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. En supprimant les groupements acétyl, les HDAC réduisent la transcription génique (Verdone et al., 2005).

β -OHB est un inhibiteur endogène des enzymes HDAC de classe 1 qui regroupe les protéines HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8 (Newman and Verdin, 2014b; Newman and Verdin, 2017). In vitro, une

étude démontre que β -OHB inhibe également HDAC4 appartenant à la famille des HDAC de classe 2. L'activité inhibitrice des HDAC par β -OHB semble être directe, cependant avec une IC_{50} élevée (entre 2 et 5 mM) (Shimazu et al., 2013). Il apparaît également dans cette étude que l'AcAc inhibe les HDAC, mais à des concentrations nettement plus importantes que β -OHB (10-30 mM). Néanmoins, cette propriété est sujette à controverse. Récemment, un article a remis en cause cette propriété en montrant que β -OHB n'induit pas d'augmentation du taux d'acétylation des histones dans de nombreux types cellulaires. Les auteurs expliquent qu'il ne présente pas d'activité inhibitrice des HDAC in vitro contrairement à son homologue structurale appartenant à la famille des acides gras à courte chaîne, le butyrate (Chriett et al., 2019).

2. β -Hydroxybutyrylation des protéines

β -OHB induit une modification post-traductionnelle des protéines, dont les histones (Xie et al., 2016). Récemment, l'ajout de groupements acyle à courtes-chaines (moins de 6 atomes de carbones autre qu'un groupement acétyle ou formyle) sur les résidus lysines des histones a été mis en évidence dans des cellules humaines (Ruan and Crawford, 2018). Ces modifications post-traductionnelles des résidus lysines incluent la propionylation, la butyrylation ou encore la β -hydroxybutyrylation (Ruan and Crawford, 2018). Une analyse par western blot montre que les taux de β -hydroxybutyrylation des résidus lysines présents sur des histones de cellules humaines sont corrélés avec le taux de β -OHB exogène (Xie et al., 2016). A ce jour, une quarantaine de sites ont été identifiés par spectrométrie de masse, dans les cellules humaines et le jeûne augmente de 40 fois l'abondance de β -hydroxybutyrylation de ces sites (Newman and Verdin, 2017; Ruan and Crawford, 2018). L'impact de ce type de modification ainsi que les acteurs intervenant dans la régulation de la β -hydroxybutyrylation restent méconnus. Une publication récente met en évidence que la protéine p53 peut être modifiée par β -hydroxybutyrylation sur trois de ses résidus lysines (Liu et al., 2019). Les conséquences de cette modification post-traductionnelle seraient une diminution de son taux d'acétylation et une diminution de l'expression des gènes en aval de p53, permettant aux auteurs de conclure que la β -hydroxybutyrylation représenterait un mécanisme de régulation de l'activité de p53 (Liu et al., 2019).

3. Récepteurs au β -OHB

β -OHB est décrit pour se lier à deux récepteurs couplés à une protéine G (GPR). Le premier récepteur décrit est la molécule « Hydroxycarboxylic acid receptor 2 » (HCAR2) encore appelée GPR109A, exprimé par de nombreux types cellulaires dont les adipocytes, la microglie, les monocytes, les macrophages ou encore les cellules épithéliales (Newman and Verdin, 2017). L'activation du

récepteur induit des réponses anti-inflammatoires par les cellules épithéliales et une réduction de la lipolyse par les adipocytes (Graff et al., 2016; Taggart et al., 2005). Ce mécanisme sur les adipocytes peut être assimilé à un rétrocontrôle négatif par lequel β -OHB, en se fixant sur HCAR2, inhibe la lipolyse adipocytaire qui fournit les acides gras nécessaires à la formation des corps cétoniques par les hépatocytes. Il apparaît également que, en se liant à HCAR2 exprimé par la microglie, β -OHB empêche l'inflammation médiée par NF- κ B via PGD2, produite par l'enzyme COX1, conduisant à une neuro-protection dans un modèle d'accident vasculaire cérébral murin (Rahman et al., 2014). HCAR2 est également un récepteur pour les acides gras à courte chaîne qui représentent des analogues structuraux des corps cétoniques. Son activation dans l'épithélium intestinal par les acides gras à courte chaîne entraîne une activation de l'inflammasome NLRP3, liée à un efflux de potassium (Macia et al., 2015; Munoz-Planillo et al., 2013). Ce dernier point contraste de façon intéressante avec le rôle du β -OHB qui a été décrit comme supprimant l'activation de l'inflammasome NLRP3, indépendamment de HCAR2, dans des macrophages murins. En effet, β -OHB prévient la chute du taux de potassium intracellulaire en réponse à des activateurs de NLRP3 (Youm et al., 2015).

Le deuxième récepteur décrit pour lier β -OHB est la molécule « Free Fatty Acid Receptor 3 » (FFAR3) ou GPR41. Ce récepteur est exprimé par les cellules entéroendocrines et les neurones de nombreux ganglions (cervical supérieur, sympathique thoracique, prévertébraux, de la racine dorsale et trigéminals) (Nohr et al., 2015). L'effet de β -OHB sur FFAR3 est controversé : une étude rapporte un effet antagoniste de β -OHB, entraînant une diminution du tonus sympathique ou encore une diminution de la fréquence cardiaque (Kimura et al., 2011) alors qu'une autre étude met en évidence un effet agoniste sur des rats, en permettant la régulation des canaux calciques dépendant du voltage couplés au récepteur FFAR3 (Won et al., 2013).

Il est important de noter que seul le β -OHB est un ligand de ces récepteurs, l'acétoacétate ne liant ni HCAR2 (Puchalska and Crawford, 2017) ni FFAR3 (Kimura et al., 2011).

ii. Fonctions de signalisation indirectes

1. Augmentation du pool d'acétyl-CoA, substrat pour l'acétylation des protéines

L'oxydation des corps cétoniques conduit indirectement à une augmentation des niveaux d'acétyl-CoA (Newman and Verdin, 2017). Ce métabolite est décrit pour agir sur l'acétylation des protéines et la survie cellulaire (Marino et al., 2014; Mehta et al., 2017). Comme mentionné précédemment, la formation d'acétyl-CoA à partir des corps cétoniques peut résulter de leur oxydation dans la

mitochondrie. Les taux intramitochondriaux d'acétyl-CoA permettent l'acétylation des protéines mitochondriales (He et al., 2012) et il a été montré une augmentation des niveaux d'acétylation des protéines mitochondriales pendant une période de restriction calorique (Schwer et al., 2009). L'acétyl-CoA peut également être cytoplasmique suite au transport du citrate mitochondrial dans le cytoplasme via la navette citrate/malate et sa conversion en acétyl-CoA par l'enzyme « ATP-citrate lyase » (ACLY) (Pietrocola et al., 2015). L'Acétyl-CoA cytoplasmique permet l'acétylation des protéines comme les histones (Mehta et al., 2017). Une étude démontre que, sur des macrophages M2, la polarisation avec l'IL-4 induit une augmentation des taux d'acétyl-CoA via l'enzyme ACLY. L'inhibition d'ACLY empêche l'augmentation d'acétyl-CoA induite par l'IL-4 et conduit à une diminution d'expression des gènes M2 (Covarrubias et al., 2016).

2. Synthèse de neurotransmetteur

Des études utilisant du β -OHB marqué isotopiquement montrent qu'il peut être utilisé comme substrat pour former de la glutamine et d'autres acides aminés (Eloqayli et al., 2011). Ce mécanisme serait impliqué dans la biosynthèse du γ -aminobutyrique acide (GABA) par les neurones GABAergiques. Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur, à l'inverse du glutamate, neurotransmetteur exciteur. La glutamine est exportée des astrocytes pour être convertie en glutamate par les neurones et être décarboxylée pour former le GABA. Le glutamate peut aussi être transformé en oxaloacétate par le don de son groupement amino et ainsi former de l'aspartate et de l' α -cétooglutarate (McNally and Hartman, 2012; Newman and Verdin, 2017). Des données cliniques montrent que des enfants épileptiques sous régime cétogène ont une fréquence de crise diminuée, corrélée à un taux de GABA dans le liquide céphalorachidien plus élevé que chez des enfants sous régime normal (Dahlin et al., 2005). L'injection d'AcAc ou de β -OHB dans le synaptosome est associée à une diminution de la transformation du glutamate en aspartate au profit d'une augmentation de la formation de GABA (Daikhin and Yudkoff, 1998). La culture d'astrocytes en présence d'AcAc confirme le fait que la conversion de glutamate en aspartate est réduite (Yudkoff et al., 1997). L'AcAc protège également de la toxicité induite par le glutamate in vitro sur des neurones de l'hippocampe de rats (Noh et al., 2006).

iii. Diète Cétoène

a. Généralités/Définition

La diète cétoène est un régime alimentaire pauvre en glucides et riche en graisses. Ce régime attire de plus en plus l'attention en tant que stratégie potentielle de perte de poids en raison de

l'engouement pour les régimes à faible teneur en glucides, qui avait commencé avec le régime Atkins (un régime à très faible teneur en glucides et en protéines, qui a connu un succès commercial et a popularisé les régimes à faible teneur en glucides à partir des années 1970). Aujourd'hui, d'autres régimes à faible teneur en glucides, y compris les régimes Paleo, South Beach et Dukan, sont tous riches en protéines mais modérés en gras. En revanche, le régime cétogène se distingue par sa teneur exceptionnellement élevée en matières grasses, généralement de 70 % à 80 %, mais avec un apport modéré en protéines (10 % à 20 %). La faible teneur en glucides (5 % à 10 %), prive l'organisme de glucose comme source énergétique, au dépend des corps cétoniques produits à partir de la matière grasse. De nombreuses données récentes suggèrent que le régime cétogène pourrait avoir un rôle thérapeutique dans de nombreuses maladies.

b. Essais cliniques / applications

Pour autant, ce régime est utilisé depuis de nombreuses décennies pour traiter certaines maladies. Au XIX siècle, le régime cétogène était couramment utilisé pour aider à contrôler le diabète. En 1920, il a été développé et introduit comme traitement efficace de l'épilepsie à la clinique Mayo par le docteur Russel Wilder qui avait remarqué qu'un jeûne absolu stoppait les crises (Winesett et al., 2015). Le régime cétogène a également été testé et utilisé dans différents cas y compris dans le cadre de nombreuses pathologies.

i. Longévité et qualité de vie

Deux études majeures ont récemment décrit des effets sur la longévité, la mémoire et la santé sur des souris mâles nourries constamment ou épisodiquement avec un régime cétogène. Dans la première étude (Newman et al., 2017), les auteurs ont comparé des souris nourries alternativement une semaine avec un régime cétogène et une semaine avec un régime classique avec des souris nourries constamment avec le régime cétogène et des souris nourries avec un régime classique. Les résultats montrent que les souris nourries alternativement avec le régime cétogène présentent une réduction de la mortalité entre l'âge de 12 mois et 36 mois mais pas d'effet sur la durée de vie moyenne de la souris, aux alentours de 36 mois. Cette observation n'apparaît pas sur les souris nourries constamment avec le régime cétogène. De plus, les souris âgées et nourries alternativement présentent une amélioration de la mémoire. Le mécanisme avancé pour expliquer ces résultats est un changement du transcriptome avec une suppression de l'expression de nombreux gènes codant pour la synthèse d'acides gras, le métabolisme du glucose et la synthèse protéique mais aussi l'augmentation des gènes codant pour l'oxydation des acides gras, des protéines mitochondriales et des cibles des protéines de la famille PPAR. L'activation des membres de PPAR a

été décrite notamment en réponse à un jeûne ou en cas de restriction calorique (Badman et al., 2007; Barger et al., 2017).

La deuxième étude utilise uniquement des souris placées constamment sous régime cétogène contre un régime classique et un régime à haute teneur de matière grasse et enrichi en glucide (non évoqué ici) (Roberts et al., 2017). Les auteurs mettent en avant une amélioration de la durée de vie des souris sous régime cétogène avec une augmentation de 13.6% de la médiane de l'espérance de vie, comparativement à un régime classique. Les souris vieillissent également en meilleure santé (coordination, endurance, force) et ont également une meilleure mémoire. Les raisons évoquées sont multiples. Tout d'abord, la prévention du gain de poids au cours du régime aurait des effets positifs sur la longévité des animaux. Physiologiquement, les souris âgées sous régime cétogène ont un poids plus léger et un taux de masse grasse diminuée comparées aux souris classiquement nourries et au même âge. Les auteurs évoquent également un niveau d'activation réduit de la voie de signalisation mTOR dans le foie, un taux de protéines hépatiques acétylées 5 fois supérieur au groupe contrôle et 2,5 fois supérieur dans les muscles. Les histones et p53 font parties des protéines retrouvées acétylées. L'hyperacétylation de p53 avait déjà été décrit comme inhibant mTOR et sa signalisation et qu'une diminution de l'activité de mTOR peut augmenter l'espérance de vie (Houtkooper et al., 2010; Schupp et al., 2013).

ii. La perte de poids

La perte de poids associée au régime cétogène est incontestée (Kosinski and Jornayvaz, 2017; Shai et al., 2008). Néanmoins, les mécanismes impliqués diffèrent selon les théories. Certains chercheurs suggèrent que le régime cétogène n'apporte aucun avantage métabolique et que la perte de poids résulte d'une sensation de satiété grâce aux protéines contenues dans le régime entraînant un apport calorique réduit (Westerterp-Plantenga et al., 2009). Une autre hypothèse repose sur l'idée que le régime induit un avantage métabolique. Premièrement, une diminution de l'appétit due à l'effet de satiété des protéines mais aussi aux hormones de contrôle de l'appétit et aux corps cétoniques qui auraient une action suppressive de l'appétit. Deuxièmement, le régime induirait une réduction de la lipogenèse et une augmentation de la lipolyse. Troisièmement, le régime cétogène conduirait à une réduction du quotient respiratoire au repos et, par conséquent, une plus grande efficacité métabolique dans la consommation des graisses. Enfin, le régime entraînerait une augmentation des coûts métaboliques de la gluconéogenèse et de l'effet thermique des protéines ce qui permettrait également d'expliquer les raisons de la perte de poids (Fine and Feinman, 2004).

iii. Les maladies cardiovasculaires

De nombreux éléments rapportent un bénéfice du régime cétogène dans les maladies cardiovasculaires. Des études récentes ont démontré qu'une diminution des taux de glucides à des niveaux entraînant une cétose physiologique aurait des conséquences bénéfiques sur le profil lipidique sanguin (diminution du taux de cholestérol LDL, lipoprotéines à faible densité, et augmentation du taux de cholestérol HDL, lipoprotéines à haute densité) (Kosinski and Jornayvaz, 2017; Shai et al., 2008). Le régime cétogène présente des effets marqués sur les taux de triglycérides sanguins, de par leur mobilisation pour la synthèse en corps cétoniques, mais il y a aussi des effets positifs significatifs sur la réduction du cholestérol total et l'augmentation des lipoprotéines de haute densité (Sharman et al., 2002). De plus, il a été rapporté que le régime cétogène augmente la taille et le volume des particules lipoprotéiques de faible densité qui diminuent les risques cardiovasculaires comparativement aux particules lipoprotéiques de faible densité, plus petites et plus denses qui sont associées à un risque athérogène accru (Volek et al., 2005). Enfin, un taux de glucose sanguin faible entraîne une diminution du taux d'insuline et ralentit alors la production endogène de cholestérol car l'enzyme hépatique clé dans la synthèse de cholestérol, l'oxydoréductase hydroxyméthylglutaryl-CoA, étant activée par l'insuline (Harris et al., 2000). Une cétose physiologique peut ainsi améliorer le profil lipidique.

iv. Diabète de type II.

La résistance à l'insuline est la principale cause conduisant au diabète de type II. Elle se caractérise par une capacité altérée des cellules musculaires à capter le glucose circulant. Une grande proportion des glucides issus du régime alimentaire sera convertie en lipides par le foie et ne sera pas oxydée par les muscles squelettiques pour fournir de l'énergie. Plusieurs études ont été publiées sur l'effet d'un régime cétogène chez des sujets obèses sélectionnés avec des taux élevés de glucose circulant et cholestérol. Après plusieurs semaines (16 ou 24 semaines), la mise sous régime cétogène a montré des effets sur la perte de poids, la diminution du taux de cholestérol total, une augmentation du taux de HDL, une diminution du taux de LDL et une diminution du taux de glucose circulant (Dashti et al., 2004; Yancy et al., 2005). A noter que dans l'étude de 16 semaines (Yancy et al., 2005), l'amélioration observée avec le régime cétogène a été constatée alors que 17 des 21 participants ont abandonné leur traitement antidiabétique durant l'étude. Une réduction des glucides conduit à une réduction des taux d'insuline afin de favoriser l'utilisation des corps cétoniques comme substrat énergétique, amenant à une réduction significative de la résistance à l'insuline (Nielsen and Joensson, 2008; Paoli et al., 2013).

v. Epilepsie

Depuis son développement et son utilité reconnue contre l'épilepsie dans les années 1920 (Peterman, 1925), le régime cétogène a été fréquemment utilisé comme traitement non pharmacologique de l'épilepsie infantile pharmaco-résistante (Neal et al., 2008; Weijenberg et al., 2018). Dans l'étude de Neal paru dans The Lancet en 2008, les enfants sélectionnés pour participer à cette étude avaient entre 2 et 16 ans et présentaient des crises épileptiques journalières ou plus de 7 crises par semaine, avec une résistance à au moins deux médicaments antiépileptiques. Après 3 mois, le régime cétogène a permis une réduction drastique des crises épileptiques, allant jusqu'à une réduction de plus de 90 % pour 7 % des enfants soumis au régime cétogène. Le mécanisme par lequel les corps cétoniques permettent une réduction des crises épileptiques n'est pas bien décrit. Cependant des pistes sont avancées comme l'augmentation de la synthèse du neurotransmetteur GABA induite par les corps cétoniques (voir paragraphe « Synthèse de Neurotransmetteur »).

vi. Le cancer

La plupart des cellules cancéreuses agressives sont caractérisées par un métabolisme altéré du glucose (Annibaldi and Widmann, 2010). Le devenir du glucose est multiple pour ces cellules. Outre le devenir énergétique, il participe à la production de molécules nécessaires à leur prolifération ainsi qu'à la synthèse de peptides aux propriétés antioxydantes (Annibaldi and Widmann, 2010; Romero-Garcia et al., 2011). D'un point de vue métabolique, les cellules cancéreuses utilisent préférentiellement la glycolyse aérobie, appelée l'effet Warburg : le pyruvate généré à partir des molécules de glucose est réduit en lactate plutôt que converti en acétyl-CoA mitochondrial, alimentant le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire, malgré la présence d'oxygène (Hanahan and Weinberg, 2011). A cela s'ajoute certaines tumeurs comme le neuroblastome qui présente un métabolisme oxydatif réduit avec des activités des complexes de la chaîne respiratoire faibles, associé à un faible nombre de copies du génome mitochondrial (Morscher et al., 2015). C'est dans ce contexte que le régime cétogène s'est positionné en tant que stratégie pour limiter la prolifération tumorale. De nombreuses études précliniques ont été réalisées sur des patients présentant des cancers d'origines différentes. L'étude de Weber (Weber et al., 2018) a synthétisé l'ensemble des études précliniques réalisées en fonction des types de cancer. Il ressort de cette étude une hétérogénéité quant aux effets du régime sur les tumeurs. En effet, on notera que le glioblastome représente le cancer le mieux étudié avec 8 études précliniques dont 6 rapportent des effets anti-tumoraux alors que le cancer du rein n'est concerné que par 2 études avec des résultats mitigés, l'une rapportant des effets secondaires sévères et l'autre des effets pro-tumoraux.

Néanmoins, les mécanismes expliquant les effets anti-tumoraux sont multiples : une diminution du taux de glucose et une augmentation du taux des corps cétoniques et d'acides gras circulant. Cela rend les tumeurs plus sensibles aux traitements de chimiothérapie ou radiothérapie vis-à-vis de leur métabolisme dépendant du glucose et de façon plus prononcée sur les tumeurs présentant des dysfonctions mitochondriales. Le régime cétogène a donc été proposé comme une thérapie adjuvante dans certains types de cancer (Allen et al., 2014). Un autre mécanisme est le taux d'insuline réduit qui entraîne une sous-régulation des voies de signalisation d'oncogènes activés par les récepteurs à l'insuline surexprimés par les cellules tumorales (Klement, 2019).

4. Contexte et objectifs

Les macrophages participent au maintien de l'homéostasie tissulaire par de nombreux mécanismes, comme par exemple la détection et l'élimination des microbes et des cellules mortes et la réparation et la cicatrisation tissulaire. Lorsque les macrophages sont en nombre insuffisant pour remplir leurs fonctions, un recrutement de monocytes circulants est nécessaire afin de restaurer le pool de macrophages présents (Okabe and Medzhitov, 2016).

La différenciation des monocytes en macrophages est induite et régulée par des facteurs produits localement qui, en fonction du contexte, favorisent la génération de macrophages inflammatoires ou de macrophages immunorégulateurs/réparateurs. Ainsi, les macrophages acquièrent un phénotype et des propriétés adaptées aux besoins tissulaires. En fonction de la nature du danger, il existe donc une multitude de macrophages différents rendant leur classification compliquée. Néanmoins, bien que réductrice, une classification, proposée par Alberto Mantovani dans les années 2000, reste encore largement utilisée. Elle oppose les macrophages inflammatoires (M1) aux macrophages immunorégulateurs et réparateurs (M2), à l'image de la classification Th1/Th2. Bien que cette classification bidimensionnelle ait permis d'aborder la diversité phénotypique des macrophages et de comparer les différentes sous-populations décrites dans la littérature, elle sous-estime très largement la multitude de profils de macrophages qui sont retrouvés *in vivo* (Mantovani et al., 2004a; Xue et al., 2014). Une classification plus récente propose que les macrophages soient définis selon trois grandes propriétés : réparation, inflammation et immunorégulation (Mosser and Edwards, 2008). Cependant, la classification binaire M1/M2 reste encore largement utilisée par les auteurs.

Jusqu'à récemment, les études portant sur la polarisation des macrophages se sont focalisées sur les signaux immunitaires. Cependant, comme évoqué précédemment, de nombreux signaux participent à ce processus, tels que la pression en oxygène ou encore des métabolites. En effet, le métabolisme n'a pas uniquement comme finalité la production d'ATP pour fournir de l'énergie aux macrophages, il joue un rôle direct dans l'acquisition de propriétés inflammatoires, immunorégulatrices ou réparatrices (Galvan-Pena and O'Neill, 2014). Il a ainsi été démontré que le profil inflammatoire des macrophages requiert un métabolisme glycolytique, l'utilisation de la voie des pentoses phosphates ou encore l'accumulation d'intermédiaires du cycle de Krebs (O'Neill and Pearce, 2016). A l'inverse, les macrophages immunorégulateurs/réparateurs présentent un métabolisme majoritairement oxydatif. Les mitochondries sont également impliquées dans les phases effectrices, comme le processus d'efferocytose et de phagocytose ou dans la synthèse des cytokines anti-inflammatoires

(O'Neill et al., 2016; Wang et al., 2017). Ainsi, de nombreuses études soulignent aujourd'hui l'importance du métabolisme et de sa régulation sur les fonctions des macrophages. Ces études permettent également de suggérer qu'il est possible de moduler le phénotype des macrophages en agissant sur leur métabolisme. Certains intermédiaires ou produits des voies métaboliques présentent des fonctions de molécules de signalisation, comme le succinate qui stabilise le facteur de transcription HIF-1 α ou encore des fonctions microbicides pour le NO et les ROS (Tannahill et al., 2013; Vatansever et al., 2013)

Ainsi, comprendre comment agir sur le métabolisme des macrophages et identifier les facteurs naturellement présents dans les tissus et susceptibles d'orienter le phénotype des macrophages dans un contexte pathologique est essentiel.

L'objectif de cette thèse a été d'étudier in vitro l'impact du régime cétogène et des corps cétoniques sur les macrophages humains d'un point de vue phénotypique et d'un point de vue métabolique.

5. Résultats

Les résultats présentés dans ce manuscrit portent sur deux études :

- la première porte sur l'impact des corps cétoniques sur le phénotype des macrophages humains.
- la deuxième étude porte sur l'effet des corps cétoniques dans un contexte d'acidose lactique.

a. Etude 1 : Impact du régime cétogène sur la cicatrisation et rôle de l'acétoacétate sur la génération de macrophages réparateurs

i. Contexte et objectifs de l'étude

Les macrophages participent à de nombreux processus physiologiques comme la défense de l'organisme et la réparation/cicatrisation des tissus lésés. Le phénotype des macrophages est conditionné par la nature des signaux, immunologiques et non immunologiques, présents localement, tout au long du processus de différenciation. Il est aujourd'hui acquis que le phénotype des macrophages est également dépendant de leur métabolisme, lui-même conditionné par la nature des nutriments qui sont à sa disposition.

Le régime cétogène induit la libération dans la circulation générale des corps cétoniques β -hydroxybutyrate et acétoacétate après β -oxydation des acides gras par les hépatocytes. Ces corps cétoniques sont utilisés par les cellules extra-hépatiques comme substrat énergétique.

Cette étude avait comme objectif d'analyser le phénotype des macrophages générés *in vitro* en présence de corps cétoniques dans un milieu pauvre en glucose (mimant des conditions d'un régime cétogène).

ii. Résultats de l'étude

1. *L'acétoacétate induit l'expression de molécules impliquées dans les processus de réparation/cicatrisation par les macrophages humains*

Des macrophages humains ont été générés *in vitro* par culture de monocytes en l'absence (M ϕ) ou en présence de 5 mM d'acétoacétate (AcAc-M ϕ). Après 5 jours de culture, les AcAc-M ϕ conservent une expression équivalente des marqueurs macrophagiques CD14 et CD163 que les M ϕ , et expriment des niveaux faibles des marqueurs de DC CD1a (Figure 1a). L'expression de nombreux transcrits dont l'expression est dépendante du M-CSF, est équivalente entre les deux populations (Figure Supplémentaire 1a). La production d'IL-10 et d'IL-12p70 est également inchangée, tout comme l'activité de phagocytose (Figure 1a). Cependant, et de façon intéressante, les AcAc-M ϕ sécrètent, comparativement aux M ϕ , des taux nettement plus élevés des facteurs solubles VEGF-A

et G-CSF impliqués dans la néovascularisation et des facteurs impliqués dans la régénération de l'épithélium : OSM et HB-EGF (Figure 1b). Ces facteurs interviennent dans le processus de cicatrisation qui est, schématiquement, organisé en 4 étapes successives et interconnectées : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération des kératinocytes et le remodelage tissulaire (Ding and Tredget, 2015). Nous avons donc évalué l'expression d'autres transcrits impliqués dans l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage tissulaire. Les résultats montrent que les niveaux d'expression de ces gènes sont très nettement augmentés dans les AcAc-Mφ comparativement aux Mφ (Figure 1c et d). De plus, les AcAc-Mφ sécrètent également des taux supérieurs de IL-1β, TNFα, IL-6, IL-8 et IL-α, comparativement aux Mφ, bien que les concentrations de IL-1β, TNFα et IL-6 restent inférieures à celles des macrophages inflammatoires générés en présence de GM-CSF et d'IFNγ (Figure 1e).

De plus, de nombreux gènes codant pour des chimiokines intervenant dans le recrutement des cellules immunitaires et qui ont également un rôle dans la réparation et la cicatrisation tissulaire, sont surexprimées dans les AcAc-Mφ comparativement aux Mφ, notamment CCL2 recrutant les monocytes, CCL20 et CCL18 recrutant les DC, CCL3L1 recrutant les cellules NK, CXCL5 et CXCL2 recrutant les neutrophiles et CCL22 recrutant les lymphocytes T régulateurs (Figure 1c et d). Ces premiers résultats indiquent que l'AcAc favorise l'acquisition d'un profil réparateur lors de la différenciation des monocytes humains en macrophages.

Nous avons ensuite comparé le profil des AcAc-Mφ à celui des macrophages décrits dans la littérature comme les prototypes des macrophages réparateurs, générés en présence de M-CSF et d'IL-4 (IL-4-Mφ) (Mosser and Edwards, 2008). Tout d'abord, et dans le but de comparer les IL-4-Mφ aux AcAc-Mφ, nous avons évalué les niveaux d'expression des marqueurs induits par l'IL-4 sur ces deux populations cellulaires. L'expression membranaire de dectin-1 et CD206 ainsi que l'expression de nombreux transcrits décrits comme étant dépendant de l'IL-4 sont faiblement exprimés par les AcAc-Mφ comparativement aux IL-4-Mφ (Figure Supplémentaire 1b et c). De plus, des gènes exprimés par les AcAc-Mφ ne sont pas retrouvés exprimés par les IL-4-Mφ (Figure Supplémentaire 1c). Ces résultats démontrent que les AcAc-Mφ et les IL-4-Mφ constituent deux sous-populations différentes.

Comme attendu, les IL-4-Mφ sécrètent des facteurs impliqués dans la réparation tissulaire et la cicatrisation, tels que G-CSF, OSM et VEGF-A, mais contrairement aux AcAc-Mφ ne sécrètent pas de HB-EGF (Figure 1a). La comparaison des taux de sécrétion de ces facteurs entre les AcAc-Mφ et les IL-4-Mφ montre que les AcAc-Mφ ont des taux de sécrétion de VEGF-A, G-CSF, OSM et HB-EGF

nettement supérieurs aux IL-4-Mφ (Figure 1a). Il apparaît donc que les AcAc-Mφ ont un profil réparateur plus prononcé et qu'il est acquis indépendamment de l'IL-4.

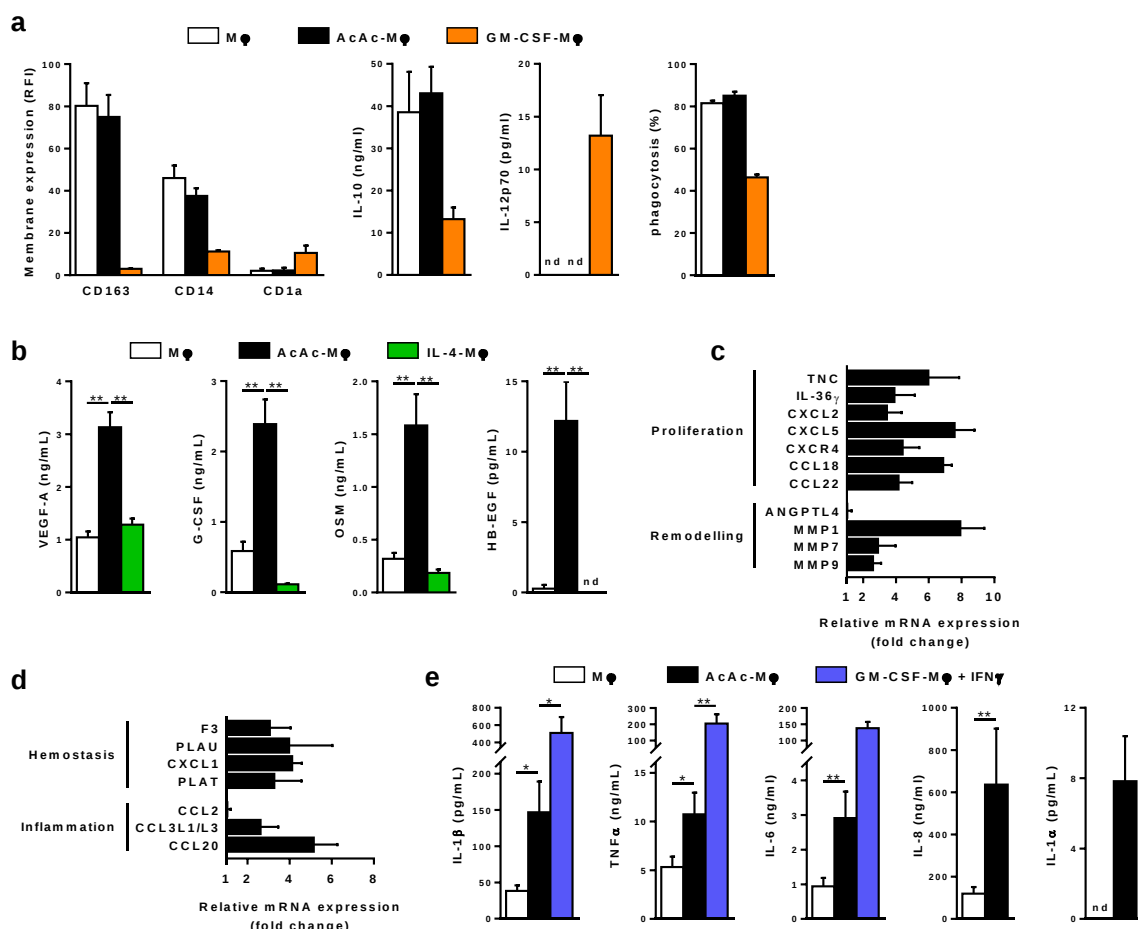


Figure 1: Les AcAc-Mφ présentent un phénotype réparateur. a-f. Les monocytes sont cultivés en M-CSF (Mφ), M-CSF plus 5 mM d'AcAc (AcAc-Mφ), GM-CSF (GM-CSF-Mφ), GM-CSF plus IFN γ (GM-CSF-Mφ + IFN γ) ou M-CSF plus IL-4 (IL-4-Mφ). a. L'expression membranaire de CD1a, CD14 et CD163 a été analysé par cytométrie en flux à J5 sur les M-Mφ, les AcAc-Mφ et les GM-CSF-Mφ (panel de gauche). L'IL-10 et l'IL-12p70 ont été quantifié après 48 h de stimulation avec LPS à J5 et l'activité de phagocytose a été analysé à J5 (panels de droite) (n=4). b. VEGF-A, G-CSF, OSM et HB-EGF ont été quantifié après 48 h de stimulation avec LPS à J5 (nd= not detected ; n=4). c. L'expression relative de TNC, IL-36 γ , CXCL2, CXCL5, CXCR4, CCL18, CCL22, ANGPTL4, MMP1, MMP7 et MMP9 a été analysé à J5 après 6 h de stimulation avec LPS, les résultats sont exprimés en ratio de l'expression des AcAc-Mφ sur l'expression des Mφ (n=3). d. L'expression relative de F3, PLA2, CXCL1, PLAT, CCL2, CCL3L1/L3 et CCL20 a été analysé à J5 après 6 h de stimulation avec LPS, les résultats sont exprimés en ratio de l'expression des AcAc-Mφ sur l'expression des Mφ (n=3). e. IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 et IL-1 α ont été quantifié après 48 h de stimulation avec LPS à J5 (nd= not detected ; n=3). a-f. moyenne $\pm$ SEM, *p<0.05, ** p<0.01, (Wilcoxon test).

2. L'acétoacétate induit l'expression de molécules impliquées dans la cicatrisation indépendamment de l'empreinte cytokinique

L'AcAc induit la génération de macrophages présentant un phénotype réparateur après différenciation en présence de M-CSF (cytokine pro-M2). Le phénotype réparateur est décrit principalement pour les macrophages de type M2. Nous nous sommes donc posé la question de la capacité de l'AcAc à induire l'expression de marqueurs de réparation par des macrophages générés *in vitro* en présence de médiateurs pro-M1. Nous avons donc comparé l'effet de l'AcAc sur la différenciation des macrophages en présence de GM-CSF (générant des macrophages M1-like), GM-CSF+IFN γ (macrophages M1) ou en présence de M-CSF et d'IL-4 (macrophages réparateurs prototypes). Après une différenciation de 5 jours en présence ou non d'AcAc, toutes les sous-populations présentent une augmentation de la sécrétion des facteurs VEGF-A, G-CSF et OSM comparativement aux cellules générées en l'absence d'AcAc (Figure 2). L'AcAc apparaît donc comme un facteur non-immunologique permettant l'acquisition d'un profil réparateur par les macrophages, quelle que soit la voie de différenciation induite.

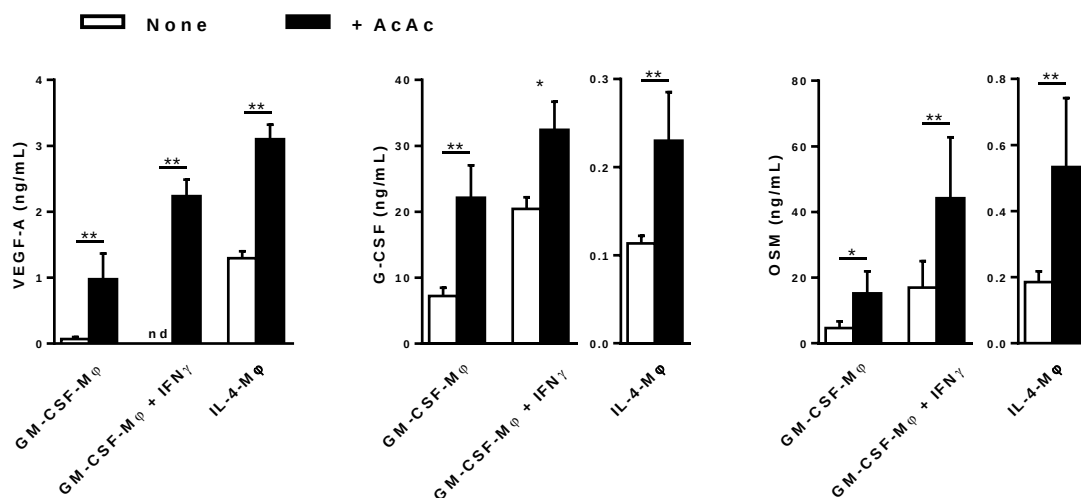


Figure 2 : L'AcAc permet l'acquisition d'un profil réparateur indépendamment de l'empreinte cytokinique polarisant les macrophages. Les monocytes sont cultivés en GM-CSF (GM-CSF-M ϕ), GM-CSF plus IFN γ (GM-CSF-M ϕ + IFN γ) ou M-CSF plus IL-4 (IL-4-M ϕ) en présence ou en absence de 5 mM d'AcAc. VEGF-A, G-CSF et OSM ont été quantifiés après 48 h de stimulation avec LPS à J5 (nd= not detected ; n=3), moyenne $\pm$ SEM, *p<0.05, ** p<0.01, (Wilcoxon test).

3. *L'acétoacétate augmente la respiration oxydative des macrophages humains*

Une fois captés par les cellules, les corps cétoniques sont métabolisés en acétyl-CoA via les enzymes cétohydrolitiques alimentant le cycle de Krebs (Newman and Verdin, 2014a). Le cycle de Krebs fournit les coenzymes réduites NADH et FADH₂ qui seront utilisés par la chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP via la phosphorylation oxydative (van der Windt and Pearce, 2012).

Les macrophages humains expriment les gènes codant pour les enzymes cétohydrolitiques BDH1, OXCT1, ACAT1 et ACAT2 même si les niveaux d'expression de BDH1, responsable de la conversion du β -hydroxybutyrate en acétoacétate, sont très faibles (Figure 3a). Les niveaux d'expression de ces enzymes ne sont pas modulés en présence d'acétoacétate. Pour évaluer le rôle de l'AcAc sur la phosphorylation oxydative des macrophages, nous avons analysé, à l'aide de l'analyseur métabolique Seahorse, la consommation d'oxygène en présence de différents inhibiteurs modifiant la chaîne respiratoire. Il ressort de cette analyse que, en présence d'AcAc, les macrophages humains présentent une augmentation significative de la respiration basale et une augmentation de la production d'ATP en lien avec la consommation d'oxygène (Figure 3b et c). La capacité maximale de la chaîne respiratoire n'est pas significativement différente mais présente une tendance à l'augmentation en présence d'AcAc (Figure 3b et c). Ces résultats montrent que la présence d'AcAc au cours de la différenciation des macrophages augmente leur capacité respiratoire.

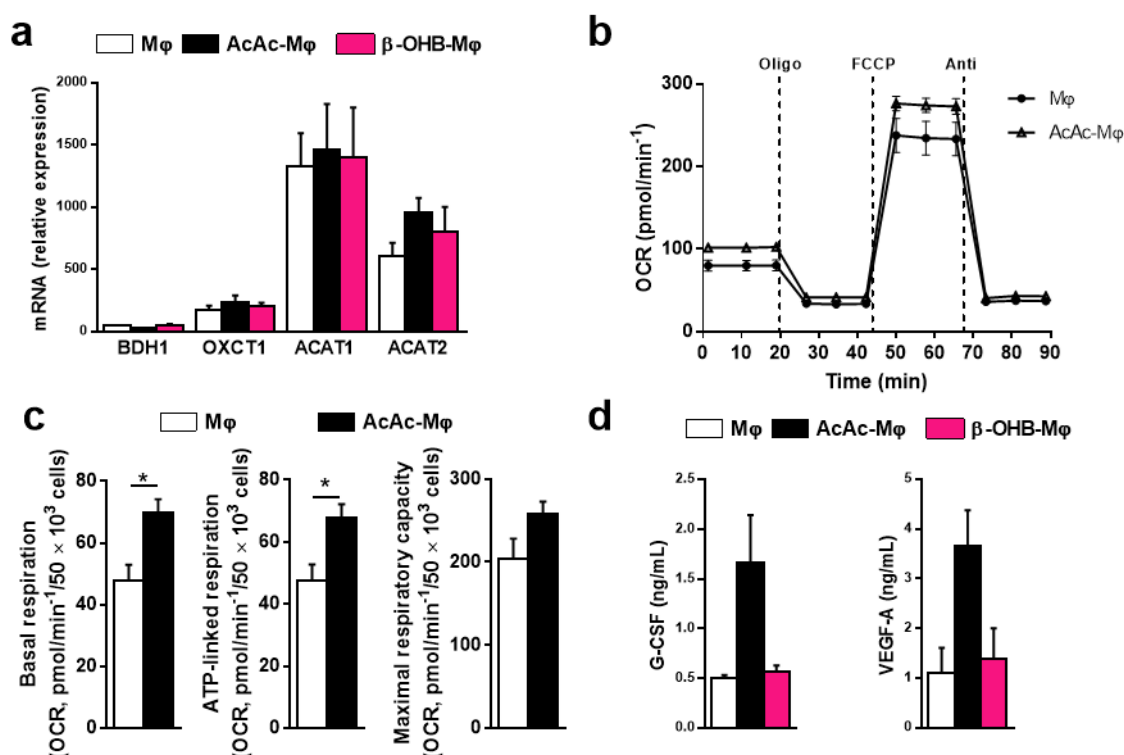


Figure 3 : L'AcAc améliore la respiration oxydative des macrophages et ces effets sur l'acquisition d'un profil réparateur ne sont pas reproduit pas le β-OHB. Les monocytes sont cultivés en M-CSF en absence (Mφ) ou en présence de 5 mM de β-OHB (β-OHB-Mφ) ou de 5 mM d'AcAc (AcAc-Mφ). **a.** L'expression relative de BDH1, OXCT1, ACAT1 et ACAT2 a été analysé à J5 (n=3). **b-c.** Profil du taux de consommation d'oxygène (OCR) des macrophages analysés par Seahorse à J5 (n=4). **b.** L'OCR a été mesuré avant et après l'ajout de façon séquentielle d'oligomycine (oligo), de carbonyle cyanide p-(trifluorométhoxy) phénylhydrazine (FCCP) et d'antimycine A (AntiA). **c.** Les taux basaux d'OCR (Basal respiration), la consommation d'oxygène lié à la synthèse d'ATP (ATP-linked respiration) et la capacité maximale de la chaîne respiratoire (Maximal respiratory capacity) ont été obtenus à partir du profil OCR général, les formules sont détaillées dans la section matériel et méthodes. **d.** G-CSF et VEGF-A ont été quantifié après 48 h de stimulation avec LPS à J5 (n=3). **a-d.** moyenne ± SEM, *p<0.05, **p<0.01, (Wilcoxon test).

4. L'acquisition d'un profil réparateur et cicatrisant est induite par l'acétoacétate, mais pas par le β-hydroxybutyrate

En accord avec le fait que le gène codant BDH1 est très faiblement exprimé, aucun effet de β-OHB n'est observé sur l'acquisition de marqueurs de réparation et cicatrisants par des macrophages humains générés en présence de M-CSF. Le β-OHB ne module pas l'expression des gènes codant pour

les enzymes cétohydrolases BDH1, OXCT1, ACAT1 et ACAT2 ni les taux de sécrétion de G-CSF et de VEGF-A après 5 jours d'exposition (Figure 3a et d). Cette absence d'effet du β -OHB, associée à la faible expression du gène codant pour l'enzyme BDH1, suggère que les macrophages humains n'ont pas la capacité d'oxyder le β -OHB. Nos résultats sont en accord avec une étude qui a récemment démontré que les macrophages murins ne peuvent pas oxyder le β -OHB car dépourvus de l'enzyme BDH1 (Puchalska et al., 2019).

5. *Le régime cétogène et l'acétoacétate accélèrent la cicatrisation tissulaire*

Pour confirmer ces résultats obtenus in vitro, nous avons voulu évaluer l'effet du régime cétogène sur la réparation tissulaire comparativement à un régime classique dans un modèle murin de cicatrisation tissulaire.

Nous avons d'abord étudié le phénotype des macrophages murins générés en présence ou en absence d'AcAc à partir de précurseurs isolés de la moelle osseuse. Comparativement aux macrophages générés en l'absence d'AcAc, les macrophages murins générés en présence d'AcAc ont des niveaux d'expression des gènes impliqués dans la cicatrisation nettement supérieurs, similaires à ceux retrouvés dans les macrophages humains (Figure 4a). Il est ainsi retrouvé une augmentation d'expression des gènes impliqués dans l'hémostase (PLAT), l'inflammation (IL-1 β , TNF α , CCL2 et IL-6), la prolifération cellulaire (TNC, HB-EGF, OSM, IL-36 γ) et le remodelage tissulaire (MMP9, VEGF-A et G-CSF).

Le modèle murin de cicatrisation consiste en l'incorporation d'une attelle autour d'une plaie dorsale, générée par ablation d'un fragment de peau et maintenue par des points chirurgicaux afin d'éviter la fermeture de la plaie par contraction musculaire.

Tout d'abord, nous avons mesuré quotidiennement la fermeture de la plaie chez des souris nourries avec un régime classique ou un régime cétogène (riche en graisses et pauvre en glucides et en protéines) favorisant la synthèse et la circulation des corps cétoniques dans l'organisme (Figure 4b et c). Nous avons observé que la fermeture de la plaie était significativement plus rapide chez les souris soumises à un régime cétogène que chez les souris ayant reçu à un régime classique (Figure 4d).

Dans une deuxième série d'expériences, et pour préciser l'impact de l'AcAc, nous avons étudié son effet sur la cicatrisation en appliquant quotidiennement 50 μ moles d'AcAc sur la plaie de souris nourries dans le cadre d'un régime alimentaire classique. Les résultats montrent qu'une application topique d'AcAc accélère la fermeture de la plaie, comparativement aux souris n'ayant eu qu'une

application de PBS (Figure 4e). Ces résultats montrent que l'utilisation d'un régime cétogène améliore la cicatrisation d'une plaie cutanée mais également que l'application topique d'AcAc sur une plaie apporte un bénéfice à la cicatrisation.

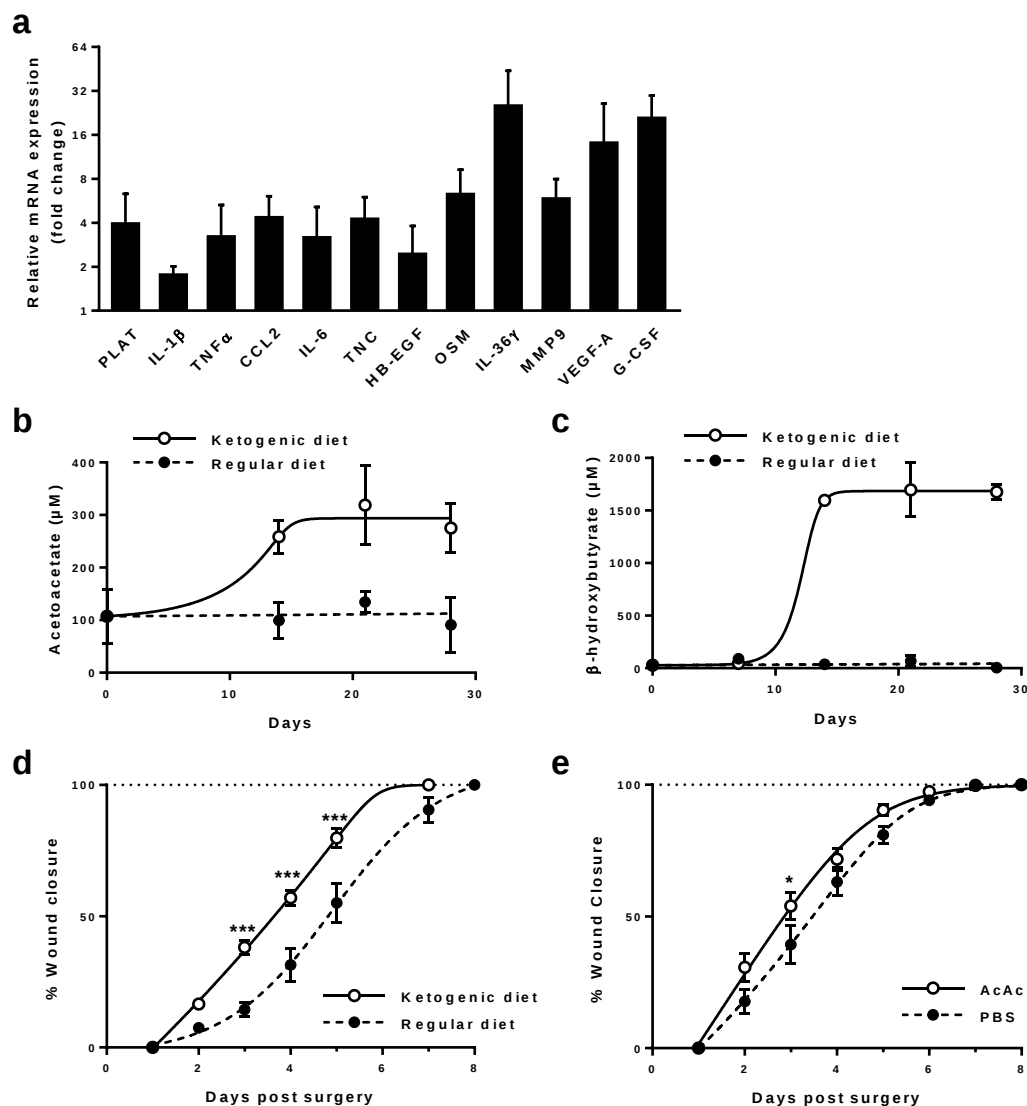


Figure 4 : L'AcAc induit un profil réparateur sur des macrophages murins et accélère la réparation tissulaire tout comme un régime cétogène. **a.** Les cellules de la moelle osseuse de souris ont été cultivées pendant 5 jours en M-CSF en absence ou en présence de 5 mM d'AcAc. L'expression relative de PLAT, IL-1 β , TNF α , CCCL2, IL-6, TNC, HB-EGF, OSM, IL-36 γ , MMP9, VEGF-A et G-CSF a été analysée à J6 après 6 h de stimulation avec LPS, les résultats sont exprimés en ratio de l'expression des BMDM en présence d'AcAc sur l'expression des BMDM en absence d'AcAc. **b-c.** Suivi des taux sériques d'acétoacétate (panel de gauche) et de β -hydroxybutyrate (panel de droite) dans des souris sous régime cétogène ou sous régime classique (n=3). **d-e.** Suivi de la cicatrisation de plaies dorsales sur

des souris sous régime cétogène ou sous régime classique (n=10) **(d)** ou sous régime classique avec application locale quotidienne de 50 μ moles d'AcAc ou de PBS (n=13) **(e)**. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fermeture de la plaie au temps t rapport à la taille initiale. moyenne $\pm$ SEM, *p<0.05, *** p<0.001, (ANOVA à deux facteurs avec un test de comparaison multiple Sidak).

6. Conclusion de l'étude

Ces données montrent que la différenciation de macrophages humains en présence de corps cétoniques permet l'acquisition d'un phénotype réparateur objectivé par l'expression et la sécrétion de nombreux facteurs impliqués dans chacune des 4 phases du processus de réparation tissulaire/cicatrisation : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire. Cette étude met également en évidence que ces effets sont induits uniquement par l'acétoacétate. En effet, le β -OHB n'induit pas de phénotype réparateur aux macrophages ; cette absence d'effet est probablement liée au fait que les macrophages humains expriment peu ou pas BDH1, responsable de l'oxydation de β -OHB en AcAc. Nos données démontrent également que l'AcAc améliore la respiration oxydative des macrophages humains. Finalement, nous avons observé qu'un régime cétogène conduit à une amélioration de la cicatrisation d'une plaie avec une vitesse de cicatrisation plus importante qu'une souris sous régime classique. De façon surprenante, l'application topique d'AcAc sur une plaie apporte un bénéfice à la cicatrisation en améliorant la vitesse de cicatrisation. Ces résultats suggèrent que l'acétoacétate favorise la cicatrisation notamment, d'un point de vue cellulaire, via l'acquisition d'un phénotype réparateur par les macrophages, cellules indispensables à la cicatrisation tissulaire.

iii. Figure supplémentaire et matériel et méthodes

1. Figure supplémentaire

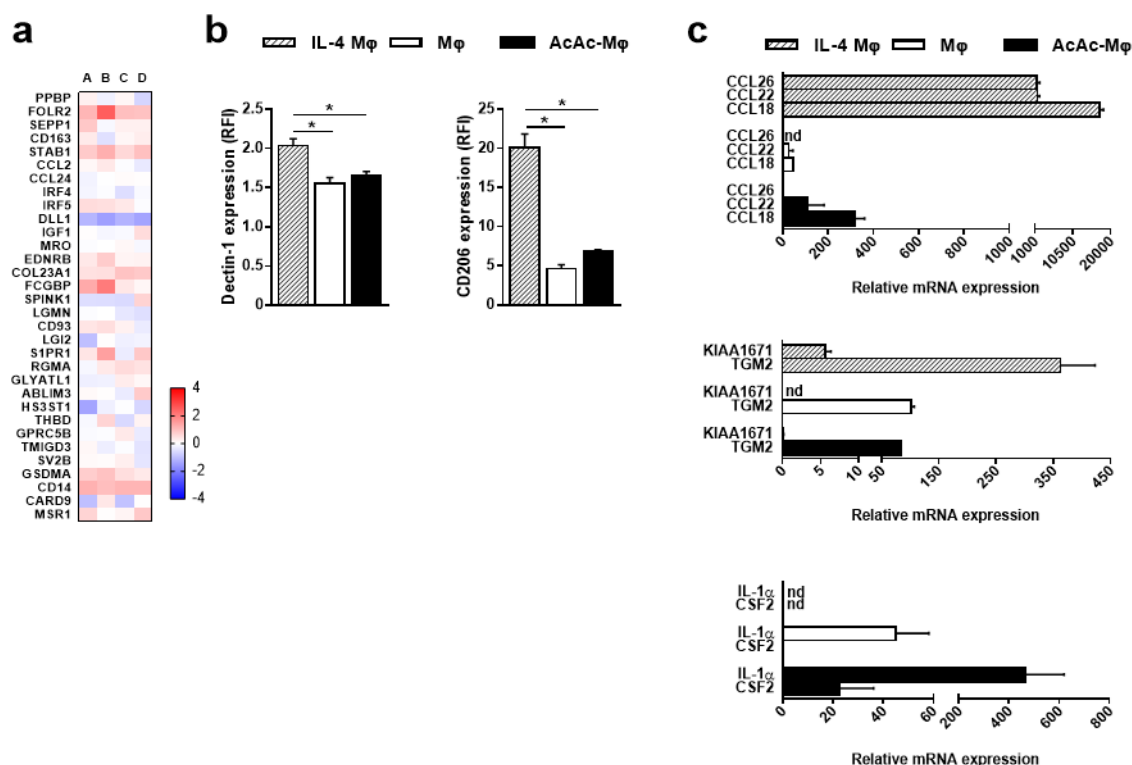


Figure supplémentaire 1 : a-c. Les monocytes sont cultivés en M-CSF (Mφ), M-CSF plus 5 mM d'AcAc (AcAc-Mφ) ou M-CSF plus IL-4 (IL-4-Mφ). **a.** L'expression relative des ARNm a été analysé à J5 sans stimulation. Les résultats sont exprimés en ratio de l'expression des AcAc-Mφ sur l'expression des Mφ et représentés selon une échelle de couleur où le bleu et le rouge représente une diminution ou une augmentation respective de l'expression en présence d'AcAc (4 donneurs différents : A, B, C et D). **b.** L'expression membranaire de Dectin-1 et CD206 a été analysé par cytométrie en flux après 48 h de stimulation avec LPS à J5 sur les M-Mφ, les AcAc-Mφ et les IL-4-Mφ (n=3). **c.** L'expression relative de CCL26, CCL22, CCL18, KIAA1671, TGM2, IL-1α et CSF2 a été analysé à J5 après 6 h de stimulation avec LPS (n=3). **a-c.** moyenne v, *p<0.05, (Wilcoxon test)

2. Isolement monocytaire et génération des cellules humaines

Les Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) sont obtenus à partir de sang de donneurs humains sains et volontaires (Etablissement Français du Sang, Angers, France, agrément ANG-2017-01) par centrifugation à gradient de densité standard sur milieu de séparation lymphocytaire (Eurobio, Courtaboeuf, France). Les monocytes CD14⁺ sont isolés par tri magnétique positif (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) avec une pureté supérieure à 98%. Les monocytes (1×10⁶ cells/mL) sont cultivés pendant 5 jours dans un milieu conditionné (CM) composé de RPMI 1640 avec de la glutamine, sans glucose (Lonza, Verviers, Belgique) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal

(SVF, Eurobio) et de 0.5 g/L D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en présence de 50 ng/mL de M-CSF (R&D Systems, Lille, France) pour générer les Mφ, ou 50 ng/mL de GM-CSF (R&D Systems) pour générer les GM-CSF-Mφ, ou 50 ng/mL de GM-CSF avec l'addition de 50 ng/mL d'IFNγ (Immunotools, Friesoythe, Allemagne) à 3 jours pour générer GM-CSF-Mφ+IFNγ. Les macrophages réparateurs prototypes (IL-4-Mφ) sont générés par la culture de monocytes en CM contenant 50 ng/mL de M-CSF pendant 5 jours avec l'addition de 50 ng/mL d'IL-4 (R&D Systems) à 3 jours.

3. Génération des macrophages murins

A partir des os des tibias et fémurs, les rubans de moelle osseuse sont récupérés à l'aide d'une seringue. Les cellules non myéloïdes sont déplétées des cellules totales de la moelle osseuse après incubation avec 10 µg/mL d'anticorps anti-CD4, CD8 et B220 pendant 20 minutes à 4°C puis 30 minutes à 37°C dans du complément de lapin. (Sigma-Aldrich). Les précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse sont cultivés pendant 6 jours en CM contenant 50 ng/ml de M-CSF (Immunotools) pour générer des macrophages dérivant de la moelle osseuse (BMDM).

4. Culture en corps cétoniques

Les monocytes ou précurseurs myéloïdes murins (1×10^6 cells/mL) exposés aux corps cétoniques sont cultivés en CM pendant 5 jours en présence de 5 mM de Lithium acétoacétate (AcAc-Mφ) (Sigma). Dans certaines expériences les monocytes sont cultivés en CM pendant 5 jours en présence de (R)-3-hydroxybutyrique acide (β-OHB-Mφ) (Sigma).

5. Quantification des cytokines

Les cellules sont comptées par cytométrie en flux par l'utilisation de 123count eBeads (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) après marquage avec 7-AAD (BD Biosciences, San Jose, CA) pour discriminer les cellules mortes et les cellules vivantes après culture. Les macrophages (1×10^6 cellules vivantes/mL) sont stimulées avec 200 ng/mL de LPS (à partir *E.coli* sérotype O111 :B4 ; Sigma-Aldrich) en CM. Les cytokines sont quantifiées après 48 h de culture par ELISA conventionnel, IL-10, IL-12p70, IL-1β, TNFα, IL-6 et IL-8 (Diaclone, Dijon, France), VEGF-A, G-CSF, OSM, HB-EGF, IL-1α (R&D Systems).

6. Analyse de cytométrie en flux

Dans le but de discriminer les cellules vivantes des cellules mortes, tous les échantillons sont marqués au 7-AAD (BD Biosciences) avant analyse par cytométrie en flux utilisant des anticorps anti-CD1a, anti-CD14 ou anti-CD163 couplés à des fluorochromes ou leurs isotypes correspondants. Les données sont acquises sur un cytomètre FACSCanto II (BD Biosciences) et analysées sur le logiciel FlowJo (Tree Star, Ashland, OR). Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence relative (RFI) défini comme le

ratio de la fluorescence spécifique (valeurs de MFI obtenus avec les anticorps spécifiques) sur la fluorescence non spécifique (valeurs de MFI obtenus avec les contrôles isotypiques).

7. Test activité phagocytaire

Les macrophages sont incubés à 37°C pendant 45 minutes avec microsphères de carboxylates de 2 µm (Thermo Fisher Scientific) préalablement opsonisées à 37°C pendant 30 minutes avec du SVF. Après incubation, les cellules sont lavées et analysées par cytométrie en flux après marquage au 7-AAD pour discriminer les cellules mortes des cellules vivantes. Les résultats sont exprimés comme un pourcentage de cellules qui ont phagocyté au minimum une bille.

8. Analyse de l'expression des ARNm

Après lyse cellulaire par utilisation du Trizol (Thermo Fisher Scientific), les ARN totaux sont extraits par l'utilisation du kit RNeasy Micro kit (Qiagen, Hildenn, Allemagne). Après transcription inverse par l'utilisation de la transcriptase inverse Superscript II (Thermo Fisher Scientific), l'expression des ARNm codant pour les protéines cibles sont analysé par qPCR. La quantification relative est calculée par l'utilisation de la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilisant RPS18, EF1A, TBP, RPL13A et PPIA comme références. La méthode de calcul est basée sur la conversion des valeurs Cq linéaires en une échelle logarithmique utilisant l'efficacité de la PCR comme fonction exponentielle. La moyenne géométrique des gènes de références est utilisée comme facteur de normalisation, ce qui permet d'éliminer les variations entre les échantillons.

9. Mesure du taux de consommation d'oxygène (oxygen consumption rate, OCR)

L'analyse du flux extracellulaire XF96 (Seahorse analyzer, Agilent Technologies, Santa-Clara, CA) a été utilisé pour déterminer le profile bioénergétique des macrophages. Après 4 jours de culture, les cellules sont plantés (50×10^3 cellules/puits) dans des plaques XF96 pendant 24 h en CM. Puis le CM est remplacé par du DMEM dépourvu de bicarbonate (Sigma-Aldrich) supplémenté de 11 mM de glucose, 2 mM de L-glutamine et 1 mM de sodium pyruvate, les cellules sont incubées dans un incubateur en l'absence de CO₂ pendant 1 h. La mesure de l'OCR est enregistrée pour analyser l'activité respiratoire mitochondriale. Après des mesures initiales représentant des conditions basales, les cellules sont exposées séquentiellement à 2 µg/mL d'oligomycine et 4 µM de carbonyle cyanide p--(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, tous de Sigma-Aldrich). La respiration non mitochondriale est obtenue par la mesure de l'OCR après addition de 2 µg/mL d'antimycine A et cette valeur est soustraite à l'ensemble des autres mesures OCR. La consommation d'oxygène liée à la synthèse d'ATP est calculée par la différence entre les mesures d'OCR basales et après ajout

d'oligomycine. La consommation d'oxygène liée à la fuite de proton est obtenue par la différence des mesures d'OCR représentant la respiration non mitochondriale aux mesures d'OCR obtenus après oligomycine. Les valeurs représentant la capacité maximale de la chaîne respiratoire sont obtenues par l'ajout de FCCP et après soustraction des valeurs d'OCR après antimycine. Trois répliquât indépendant de chaque mesure sont générés et les résultats sont normalisés par rapport à la concentration cellulaire initiale.

10. Quantification des taux sériques des corps cétoniques

Les concentrations d'acétoacétate et de β -hydroxybutyrate sont quantifiées dans le sérum des souris par l'utilisation de l'enzyme β -hydroxybutyrate dehydrogenase (3-HBDH) (Roche Applied Science). En présence d'excès de NAD ou NADH (Roche Applied Science), l'enzyme oxyde le β -hydroxybutyrate en acétoacétate ou réduit l'acétoacétate en β -hydroxybutyrate, respectivement. Cette réaction est monitorée par la mesure de l'échantillon à la longueur d'onde A340nm qui permet de suivre la conversion du NADH en NAD ou inversement par Pentra C400 (Horiba Medical, Kyoto, Japon).

11. Modèle animal de cicatrisation

Les souris sont anesthésiées par injection péritonéale d'un mixte Ketamine/Xylazine (80 mg/kg and 15mg/kg). Après épilation avec un rasoir électrique et nettoyage de la peau du dos par povidone-iodine, la peau est perforée deux fois avec un poinçon circulaire de biopsie stérile jetable (5 mm²) pour créer des plaies de pleine épaisseur (y compris le *panniculus carnosus*). Afin d'empêcher la fermeture de la plaie par contraction musculaire, un disque de silicone a été appliqué autour de chaque plaie créée, et des points de suture ont été faits sur le bord extérieur du disque de silicone. Les plaies sont recouvertes d'un pansement occlusif. Dans certaines expériences, 50 μ moles d'acétoacétate dans du PBS ou PBS seul ont été appliquées quotidiennement sur la plaie dès le premier jour. Après l'opération, les souris ont été mises en cage individuellement. Aux temps indiqués, chaque plaie a été photographiée et les zones de la plaie ont été mesurée à l'aide d'ImageJ. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'aire de la plaie initiale.

12. Statistiques

Les résultats sont représentés comme la moyenne $\pm$ SEM (Standard error of the mean). Les analyses statistiques sont réalisées à partir du logiciel Graphpad PRISM version 7.02 (www.graphpad.com), comme indiqué dans les légendes des figures.

b. Etude 2 : L'acétoacétate protège les macrophages humains d'un état de pseudo-starvation induit par une acidose lactique

i. Contexte et objectifs de l'étude

Dans les tissus lésés ou inflammés, les macrophages doivent réaliser leurs fonctions dans un environnement généralement acide (Baldini et al., 2016; Erra Diaz et al., 2018; Sun et al., 2017). Cette acidification résulte d'une hypoxie locale, potentiellement associée à une prolifération tissulaire intense. Lors des processus associés à une prolifération cellulaire massive (réparation, prolifération tumorale), les cellules présentent une glycolyse exacerbée qui se manifeste par (i) une forte consommation de glucose et (ii) une production de lactate associée à une libération de protons (Sun et al., 2017; Vander Heiden et al., 2009). L'acidification extracellulaire est un marqueur de l'inflammation qui accompagne la réparation tissulaire, l'ischémie ou la tumorigénèse (Baldini et al., 2016; Erra Diaz et al., 2018; Sun et al., 2017). Ainsi, les macrophages tissulaires et les monocytes nouvellement recrutés doivent adapter leur phénotype et/ou leur métabolisme pour exercer leurs fonctions dans un environnement hostile, caractérisé par des concentrations élevées en acide lactique.

Une étude récente du laboratoire a montré que l'acide lactique modifiait le phénotype des macrophages humains en favorisant l'acquisition d'un profil à la fois inflammatoire (de type M1) et réparateur (de type M2). Cette étude a également permis de révéler que l'acide lactique était métabolisé par les macrophages en cours de différenciation et que cette métabolisation était responsable de l'acquisition de ce profil mixte (Manuscrit en Annexe 1).

Dans la continuité de ce travail, cette deuxième étude a consisté à analyser le métabolisme des macrophages humains en présence d'acide lactique afin de comprendre comment des cellules à durée de vie longue et non proliférantes s'adaptent métaboliquement dans un contexte d'acidose lactique. De façon surprenante, il a été observé que la présence d'acétoacétate prévient l'impact de l'acide lactique sur le métabolisme cellulaire.

ii. Résumé des résultats de l'étude

1. *Les macrophages humains en acidose lactique présentent une masse mitochondriale réduite*

Pour analyser la manière dont les macrophages humains adaptent leur métabolisme au cours de la différenciation en acidose lactique, nous avons cultivé des monocytes en présence de GM-CSF

et en absence (appelés GM-Mφ) ou en présence de 10 mM d'acide lactique (pH 6.5), définie comme la concentration maximale non toxique ; ces macrophages sont nommés GM+LA-Mφ.

Tout d'abord, nous avons analysé la respiration mitochondriale en mesurant les taux de consommation d'oxygène. Dans la première étude, il avait été observé que la métabolisation par les macrophages de l'acide lactique alimentait le cycle de Krebs ; l'utilisation de lactate ^{13}C avait permis de retrouver le ^{13}C dans des intermédiaires du cycle de Krebs (Manuscrit Annexe 1).

De manière inattendue, les macrophages humains exposés, pendant 5 jours, à l'acide lactique présentent un métabolisme oxydatif diminué alors que la chaîne respiratoire reste fonctionnelle suggérant donc que la différenciation en présence d'acide lactique induit une réduction de la masse mitochondriale dans les macrophages. Pour valider cette hypothèse, nous avons suivi la masse mitochondriale au cours de la différenciation. Les résultats montrent, dans les premiers temps de la différenciation, une réduction significative des taux d'ADN mitochondriaux (mtDNA) et de l'activité de la citrate synthase, deux marqueurs de la masse mitochondriale, dans les GM+LA-Mφ, comparativement aux GM-Mφ ; la masse mitochondriale se normalise à J7. Le ratio citrate synthase sur complexe IV n'est pas affecté, en accord avec une réduction de la masse mitochondriale et de l'activité des mitochondries restantes.

L'acidose lactique résulte d'une accumulation de proton et de lactate dans l'environnement extracellulaire. Afin de déterminer si la réduction de la masse mitochondriale observée sur les GM+LA-Mφ est liée à la présence de lactate ou à l'accumulation de protons, nous avons généré des macrophages en présence soit de 10 mM de lactate à pH physiologique soit en absence de lactate à un pH acide (pH=6.5). Une réduction des taux de mtDNA est observée dans les macrophages à pH=6.5, après 4 jours, comparable à celle observée dans les GM+LA-Mφ ; au contraire, les macrophages générés en présence de lactate à pH physiologique ont des taux similaires aux GM-Mφ.

Ces résultats démontrent que les macrophages humains dans un environnement acide ont recours à une réduction de leur masse mitochondriale au cours de leur différenciation.

2. L'expression des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale n'est pas modulée en acidose lactique

Pour préserver ses fonctions, la mitochondrie a recours à un remodelage constant (Gottlieb and Bernstein, 2016). Ainsi, une diminution de la masse mitochondriale peut résulter d'une diminution de la biogénèse mitochondriale ou d'une augmentation de la mitophagie (élimination sélective des mitochondries dysfonctionnelles via l'autophagie) (Gottlieb and Bernstein, 2016;

Springer and Macleod, 2016). Dans un premier temps, nous n'avons pas observé de changement d'expression au cours du temps des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale. Il est à noter une tendance à l'augmentation après 7 jours d'exposition à l'acide lactique qui coïncide avec la normalisation des taux d'ADN mitochondriaux observés précédemment. Ainsi, la diminution de la masse mitochondriale observée en acidose lactique n'est pas due à une diminution de la biogénèse mitochondriale.

3. L'acide lactique induit une dysfonction des mitochondries

Un signe avant-coureur d'une mitophagie, synonyme de mitochondries dysfonctionnelles, est une dépolarisation de leur membrane (Twig and Shirihai, 2011). En acidose lactique, nous avons observé que les taux de mitochondries dépolarisées étaient importants dans les macrophages générés en acidose lactique, avec un pic à 3 jours. Un autre signe de la mitophagie est une réduction de la taille mitochondriale qui consiste en une réorganisation du réseau mitochondrial associée à une fission des mitochondries. Une analyse par microscopie électronique à transmission (MET) montre que les mitochondries dans les macrophages en acidose lactique ont une taille plus petite que celles des macrophages générés en l'absence d'acide lactique. De plus, la microscopie confocale met en évidence un réseau mitochondrial morcelé/fragmenté, témoin d'une fission mitochondriale dans les GM+LA-Mφ comparativement aux GM-Mφ. L'ensemble de ces données suggèrent qu'en présence d'acide lactique, les macrophages présentent des mitochondries dysfonctionnelles et une réduction du nombre de mitochondries suite à leur élimination par mitophagie.

4. L'acidose lactique amplifie le flux autophagique

La mitophagie consiste en l'élimination ciblée de mitochondries par l'autophagie (Springer and Macleod, 2016). Les mitochondries non fonctionnelles sont ainsi englouties dans des autophagosomes puis détruites après fusion avec les lysosomes. La MET montre que les GM+LA-Mφ ont des autophagosomes en quantité nettement supérieure comparativement aux GM-Mφ.

Une analyse par western blot montre une augmentation de la quantité de LC3-II, protéine associée aux autophagosomes, et du ratio LC3-II/LC3-I en acidose lactique après inhibition du flux autophagique prévenant la dégradation et la disparition de LC3-II. Ces résultats confirment l'augmentation du nombre d'autophagosomes dans les GM+LA-Mφ par rapport aux GM-Mφ.

Sur la base de ces données peut être posée l'hypothèse que, en acidose lactique, le flux autophagique serait naturellement inhibé et entraînerait l'accumulation d'autophagosomes. Premièrement, nous avons observé une surexpression des gènes impliqués dans l'autophagie dans les GM+LA-Mφ, avec

un pic à 12 heures de culture. Deuxièmement, l'expression protéique de p62, qui se lie à LC3 et est dégradée au cours de l'autophagie, est réduite en acidose lactique, supportant l'hypothèse d'un flux autophagique actif dans les GM+LA Mφ. Une inhibition du flux entraîne une accumulation des protéines p62 et LC3-II, spécialement dans les macrophages générés en acidose lactique. Ainsi, il apparaît que le flux autophagique des macrophages humains est amplifié en acidose lactique.

5. L'autophagie est indispensable à la survie des macrophages humains en acidose lactique

Sachant que le flux autophagique est intensifié en acidose lactique, nous avons émis l'hypothèse qu'interrompre ce dernier affecterait la survie des GM+LA Mφ. Nous avons donc évalué la survie des GM+LA-Mφ en présence ou non de deux inhibiteurs du flux autophagique. L'ajout des deux inhibiteurs après 2 jours de culture, quand le processus autophagique est engagé, induit une diminution importante de la survie des GM+LA Mφ, démontrant que le recours à l'autophagie est un mécanisme de survie des macrophages humains en acidose lactique.

6. Les macrophages en acidose lactique présentent un changement métabolique et physique typique des cellules en famine

L'utilisation de l'autophagie a été notamment décrite en réponse à une privation de nutriments (état de famine ou starvation en anglais). La survie des cellules nécessite qu'elles recyclent leur contenu intracellulaire afin de fournir des substrats énergétiques pour produire l'ATP (Kaur and Debnath, 2015; Palikaras et al., 2015). Sachant que la différenciation des monocytes en macrophages en acidose lactique s'accompagne d'une amplification de l'autophagie nécessaire à leur survie, nous avons émis l'hypothèse que les macrophages présentent un état proche de la starvation, alors que les nutriments ne sont pas en quantité limitée et qu'ils disposent d'oxygène dans le milieu de culture. Plusieurs paramètres ont été analysés pour évaluer cette hypothèse. Premièrement, nous avons analysé le taux de phosphorylation de l'AMP kinase, reflet de son activation, en cas de privation nutritionnelle et entraînant la chute des taux d'ATP intracellulaires. Deuxièmement, nous avons comparé les taux d'acétyl-CoA intracellulaire, marqueur du statut nutritionnel de la cellule en étant au carrefour de plusieurs voies cataboliques (sucres, acides gras et protéines). L'analyse de ces deux paramètres donnent des résultats concordants : en présence d'acide lactique, les macrophages présentent un niveau de phosphorylation de l'AMP kinase supérieur aux macrophages générés en absence d'acidose lactique, associé à un effondrement des taux d'acétyl-CoA intracellulaires. Ces données démontrent qu'en présence d'acide lactique, les macrophages présentent des caractéristiques de cellules en starvation.

Enfin, nous avons analysé la taille cellulaire, qui est également un reflet de l'état biophysique de la cellule et qui, en cas de stress ou de privation nutritionnelle, est diminuée ; ce processus permet à la cellule de réduire la demande et la dépense énergétique (Hecht et al., 2016). Nous avons observé que les GM+LA-Mφ présentent une réduction de la taille, qui est maximale à 4 jours, suivie par une normalisation sur les temps tardifs. Cette observation a également été faite sur des cellules générées en acidose.

L'ensemble de ces données montrent que, malgré la présence de nutriments et d'oxygène, l'acide lactique entraîne un état biophysique et métabolique de starvation par les macrophages humains.

7. L'acide lactique réduit drastiquement la capture de nutriments par les macrophages humains

Pour comprendre les raisons d'un état de starvation en présence de nutriments et d'oxygène, nous avons comparé la capture de différents nutriments par les GM-Mφ et les GM+LA-Mφ. Les résultats montrent que la capture de glucose et la production de lactate par les GM+LA-Mφ est inhibée à tous les temps analysés (3, 5 et 7 jours), comparativement aux GM-Mφ, alors que les niveaux d'expression membranaires des transporteurs de glucose demeurent inchangés. Cette observation a également été faite en situation d'acidose. Une consommation de lactate est observée dans les premiers jours de la différenciation des GM+LA-Mφ comme rapporté dans la première étude (Manuscrit Annexe 1). De façon similaire au glucose, la capture d'acides aminés, dont la glutamine, est aussi inhibée en présence d'acide lactique. Ces résultats suggèrent que l'état de pseudo-starvation (i.e. en présence de nutriments) résulte d'une inhibition de la capture de nutriments par les macrophages humains pendant leur différenciation en acidose lactique.

8. Un pH extracellulaire acide conduit à une acidification intracellulaire transitoire

Des variations du pH intracellulaire peuvent conduire à des dysfonctions enzymatiques des voies métaboliques, comme observé dans des cellules tumorales cultivées en acidose extracellulaire (Marino et al., 2012; Newell and Tannock, 1989; Xie et al., 2014). Nous avons observé que l'exposition à 10 mM d'acide lactique conduit à une acidification instantanée du compartiment intracellulaire des macrophages. Cette acidification est transitoire, le pH intracellulaire revient à la normale après 24 heures. L'effondrement au cours des premières secondes d'exposition peut cependant expliquer la réduction des capacités de capture des nutriments par les macrophages en acidose lactique et le recours à l'autophagie pour favoriser la survie cellulaire.

9. L'acétoacétate protège les macrophages humains de la mitochophagie et d'un état de pseudo-starvation induits par l'acidose lactique

Les dysfonctions mitochondriales, la mitophagie et l'état de pseudo-starvation des macrophages observés en présence d'acide lactique sont autant d'arguments pour émettre l'hypothèse que l'acétoacétate, qui est un substrat énergétique oxydable par les mitochondries cellulaires sans utilisation d'ATP, peut prévenir les effets induits par l'acide lactique.

Pour évaluer cette hypothèse, nous avons comparé l'effet de l'acétoacétate sur des macrophages générés sans acide lactique (GM-Mφ) ou sous acide lactique en absence (GM+LA-Mφ) ou en présence d'AcAc (GM+LA-Mφ + AcAc). Une analyse des taux de mtDNA révèle qu'en présence d'AcAc, les macrophages ne présentent pas de diminution du nombre de copie de mtDNA. Les GM+LA-Mφ + AcAc affichent même une augmentation de ces taux à J2, comparativement aux GM-Mφ, augmentation associée avec une surexpression des gènes de la biogénèse mitochondriale. Il apparaît également que les GM+LA-Mφ + AcAc ne présentent pas d'accumulation de mitochondries dépolarisées et présentent un réseau mitochondrial non fragmenté, comparé aux GM+LA-Mφ. L'étude des paramètres de l'autophagie a permis de mettre en évidence, que ce soit par MET ou en western blot, que l'AcAc n'amplifie pas les voies de l'autophagie. La capture de glucose est inhibée dans les GM+LA-Mφ + AcAc et les GM+LA-Mφ dans les premiers temps et les deux sous-population sécrètent des taux équivalents de lactate. Cependant, la capture d'acides aminés, de glutamine et de glucose par les GM+LA-Mφ + AcAc à 5 et 7 jours est supérieure à celle observée pour les GM+LA-Mφ. Nous avons également observé que les macrophages captent l'AcAc en présence d'acide lactique et ce dès les premiers temps de culture. Finalement, nous observons que les GM+LA-Mφ + AcAc ont une taille et des taux d'acétyl-CoA intracellulaire similaires aux GM-Mφ, malgré la présence d'acide lactique. Pour autant, la chute du pH intracellulaire induite par l'acidose extracellulaire est toujours observée en présence d'AcAc.

Ces observations identifient l'AcAc comme un substrat énergétique prévenant les effets induits par l'acide lactique sur les macrophages humains, évitant ainsi l'état de pseudo-starvation et la dysfonction mitochondriale.

10. L'acétoacétate n'affecte pas le phénotype des macrophages exposés à l'acide lactique

Dans la première étude, nous avons mis en évidence que l'acidose lactique induit l'acquisition d'un phénotype mixte M1/M2 par les macrophages humains. Etant donné que le

phénotype des macrophages est lié à leur métabolisme, et sur la base de l'impact des AcAc sur le métabolisme des GM+LA-Mφ, nous avons analysé le phénotype des GM+LA-Mφ + AcAc. Les résultats montrent que les niveaux de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou réparatrices ne diffèrent pas entre les GM+LA-Mφ et les GM+LA-Mφ + AcAc. Supportant ces observations, la MET ne montre pas de signes de stress du réticulum endoplasmique en présence d'acide lactique, avec ou sans AcAc. Ceci est un premier élément de réponse suggérant que les GM+LA-Mφ et les GM+LA-Mφ + AcAc ont une capacité sécrétoire intacte.

11. Conclusion de l'étude

Cette étude a permis de montrer que les macrophages et les monocytes, qui sont des cellules non proliférantes et à durée de vie longue et pouvant être recrutés dans des environnements dépourvus de nutriments et/ou riche en acide lactique, modifient leur métabolisme pour s'adapter à ces conditions. Cette adaptation, induite par le pH extracellulaire acide, entraîne une acidification intracellulaire transitoire et un recours à un état de pseudo-starvation qui permet aux macrophages de survivre grâce au recyclage et aux nutriments endogènes produits par autophagie. L'acidose lactique a également des conséquences sur les mitochondries, entraînant des dysfonctions sur une partie d'entre elles, et conduisant à leur élimination par mitophagie. Nous avons également montré que l'AcAc se comporte comme un composé permettant aux macrophages de limiter l'impact de l'acidose lactique. En effet, alors que les macrophages ne captent plus de nutriments exogènes, l'AcAc permet (i) de maintenir fonctionnelles les mitochondries, (ii) d'éviter le recours à l'autophagie et la mitophagie et (iii) de limiter la durée de l'état de pseudo starvation. L'acétoacétate permet donc d'améliorer la résistance des macrophages exposés à un stress induit par l'acidose lactique.

iii. Manuscrit (article soumis à la revue Nature Communication)

Acetoacetate protects human macrophages from acidosis-induced pseudostarvation and mitochondrial dysfunction by metabolic reprogramming

Clément Adam^{1,#}, Léa Paolini^{1,#}, Guillaume Mabillet^{2,3}, Naïg Gueguen⁴, Laurence Preisser¹, Simon Blanchard^{1,5}, Pascale Pignon¹, Florence Manero⁶, Morgane Le Mao⁴, Alain Morel^{1,7}, Yves Delneste^{1,5}, Céline Beauvillain^{1,5,¶}, Vincent Procaccio^{4,8,¶}, Pascale Jeannin^{1,5,¶,*}

¹ CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

² GEROM, Université d'Angers, Angers, France

³ Département de Pathologie cellulaire et tissulaire, CHU d'Angers, Angers, France

⁴ Institut MitoVasc, UMR CNRS 6015 INSERM 1083, Université d'Angers, Angers, France

⁵ Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, CHU d'Angers, Angers, France

⁶ SCIAM, Université d'Angers, Angers, France

⁷ Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers, France

⁸ Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers, Angers, France

These authors contributed equally to this work

¶ These authors jointly supervised this work

* Corresponding author

Abstract

Macrophages in injured tissues must be active despite the acidic microenvironment. Little is known about the strategies they adopt to cope with acidosis. We show here that human monocytes that differentiate into macrophages in conditions of lactic acidosis display depolarized mitochondria, a transient decrease in mitochondrial mass due to mitophagy, and a major decrease in nutrient absorption, rendering their survival dependent on autophagy. These metabolic changes, resembling pseudostarvation, result from extracellular acidosis, but not from lactosis. We also report that the ketone body acetoacetate, which is produced during hypoglycemia and oxidized without the need for ATP, protects macrophages from the metabolic stress induced by acidosis. In the presence of acetoacetate, macrophages retain their mitochondrial integrity and function in conditions of acidosis, consume nutrients and do not resort to autophagy. Acetoacetate therefore seems to be an alternative fuel molecule that improves cell and tissue tolerance to acidic stress.

Introduction

Normal tissues have an extracellular pH (pHe) of ≈ 7.4 , but interstitial acidification (pHe between 5.5 and 7.0) is commonly observed in inflamed or injured tissues, during autoimmune or wound healing processes, ischemia and solid tumor growth¹⁻³. Indeed, rapid cell proliferation and/or hypoxia lead to an increase in glycolysis, with the release of lactic acid (LA), which dissociates, in the extracellular space, into lactate and protons, the excess protons causing extracellular acidosis^{2,4}. Extracellular lactate concentrations, which range between 1.8 and 2 mM in resting tissues, can reach up to 20 mM in wounds, and 40 mM in solid tumors^{2,5}. Cells tightly control their intracellular pH, but prolonged extracellular acidosis can affect several aspects of cell biology, including metabolism, signaling and transcriptional activities⁶⁻⁸.

Macrophages are innate myeloid immune cells found in almost all tissues. They play a key role in maintaining tissue homeostasis, tissue repair, and protective anti-infectious immunity, and in controlling tumor development⁹. Macrophages are sometimes likened to “firefighters”, due to the essential role they play in damaged and infected areas. Through their functional plasticity, macrophages continuously adapt their phenotypes to signals (such as immune mediators and metabolites) present in the microenvironment, thereby responding precisely to the needs of tissues⁹⁻¹¹.

In the event of severe inflammation/injury, the resident macrophages may be overwhelmed, and monocytes are therefore recruited and differentiated into macrophages⁹. The differentiation of monocytes into macrophages probably generally occurs in damaged tissues, in which LA levels may be extremely high, resulting in a low pHe. Human macrophages are

long-lived cells and their proliferation capacity is unclear^{12,13}. The ability of monocytes to survive and differentiate into macrophages under lactic acidosis conditions may therefore be crucial, to ensure the maintenance of a pool of functional macrophages in damaged tissues.

The mechanisms by which monocytes/macrophages survive in prolonged lactic acidosis conditions have yet to be determined. Indeed, the differentiation of human macrophages has mostly been studied at physiological pH (pHe = 7.2-7.4), which seems to be of limited relevance given that monocytes are mostly recruited to damaged sites. By contrast, the metabolic adaptations by which tumor cells survive and proliferate under lactic acidosis conditions have been studied in detail^{1,14}. The objective of this study was to investigate how human monocytes adapt, survive and differentiate into macrophages under lactic acidosis conditions. Experiments were conducted under atmospheric oxygen and in the presence of glucose, to rule out an effect of oxygen or glucose deprivation.

Prolonged exposure to LA affected monocyte/macrophage metabolism. Extracellular acidosis induced mitochondrial membrane depolarization and significantly decreased nutrient consumption, resulting in a dependence of the macrophages on a transient phase of autophagy for survival. We also found that acetoacetate, a ketone body produced by the liver in fasting conditions, protected the mitochondria from acidosis-induced depolarization and mitophagy, allowing the cells to continue to metabolize nutrients, thereby avoiding the need for self-catabolism to survive. Acetoacetate therefore appears to be a crucial alternative fuel metabolite of potential therapeutic interest, to increase tissue tolerance to lactic acidosis.

Results

Human macrophages have a smaller mitochondrial mass in lactic acidosis

We investigated the mechanisms by which human monocytes cope with LA, by culturing monocytes with GM-CSF (GM-M ϕ) in the presence or absence of 10 mM LA (pH=6.5), the maximum non-toxic concentration for GM-M ϕ (Supplemental Fig. S1). This concentration of LA and a pH of 6.5 are commonly observed in inflamed tissues¹⁵. Macrophages generated in the presence of LA are denoted GM+LA-M ϕ .

We first analyzed the mitochondrial respiration of macrophages, by measuring the oxygen consumption rate (OCR) of day 4 GM-M ϕ and GM+LA-M ϕ (Fig. 1a). Basal respiration, ATP-linked respiration and maximum respiratory capacity were all lower in GM+LA-M ϕ than in GM-M ϕ (Fig. 1 a&b). However, the ATP-linked respiration/maximal respiration and proton leak/maximal respiration ratios were similar in GM+LA-M ϕ and GM-M ϕ (Fig. 1c). These results suggest that day 4 GM+LA-M ϕ have a smaller mitochondrial mass, and that the residual mitochondria maintain a functional electron transport chain (ETC). Consistent with this hypothesis, mitochondrial DNA (mtDNA) content, an indicator of the mitochondrial mass, decreased markedly from day 3 to day 5 in GM+LA-M ϕ , subsequently displaying a trend towards normalization at day 7 (Fig. 1d). Accordingly, the activity of citrate synthase, another marker of mitochondrial mass, was also low in day 4 GM+LA-M ϕ , whereas the complex IV activity/citrate synthase activity ratio was not affected (Figure 1e).

Lactic acidosis results from the extracellular accumulation of lactate and protons². We therefore investigated whether the decrease in mitochondrial mass observed in GM+LA-Mφ (10 mM LA, pH=6.5) was due to acidosis or lactosis. We determined the mtDNA content in macrophages generated under conditions of acidosis (12.3 mM HCl, pH=6.5; HCl-Mφ) or lactosis (10 mM sodium lactate, pH=7.3; lactate-Mφ) alone. We found that the mtDNA content of macrophages decreased under acidosis, but not under lactosis conditions (Fig. 1f). We mimicked pathophysiological conditions more closely by generating macrophages under LA-induced rather than HCl-induced acidosis conditions in subsequent experiments.

We found that monocytes/macrophages undergo a transient decrease in mitochondrial mass under conditions of acidosis.

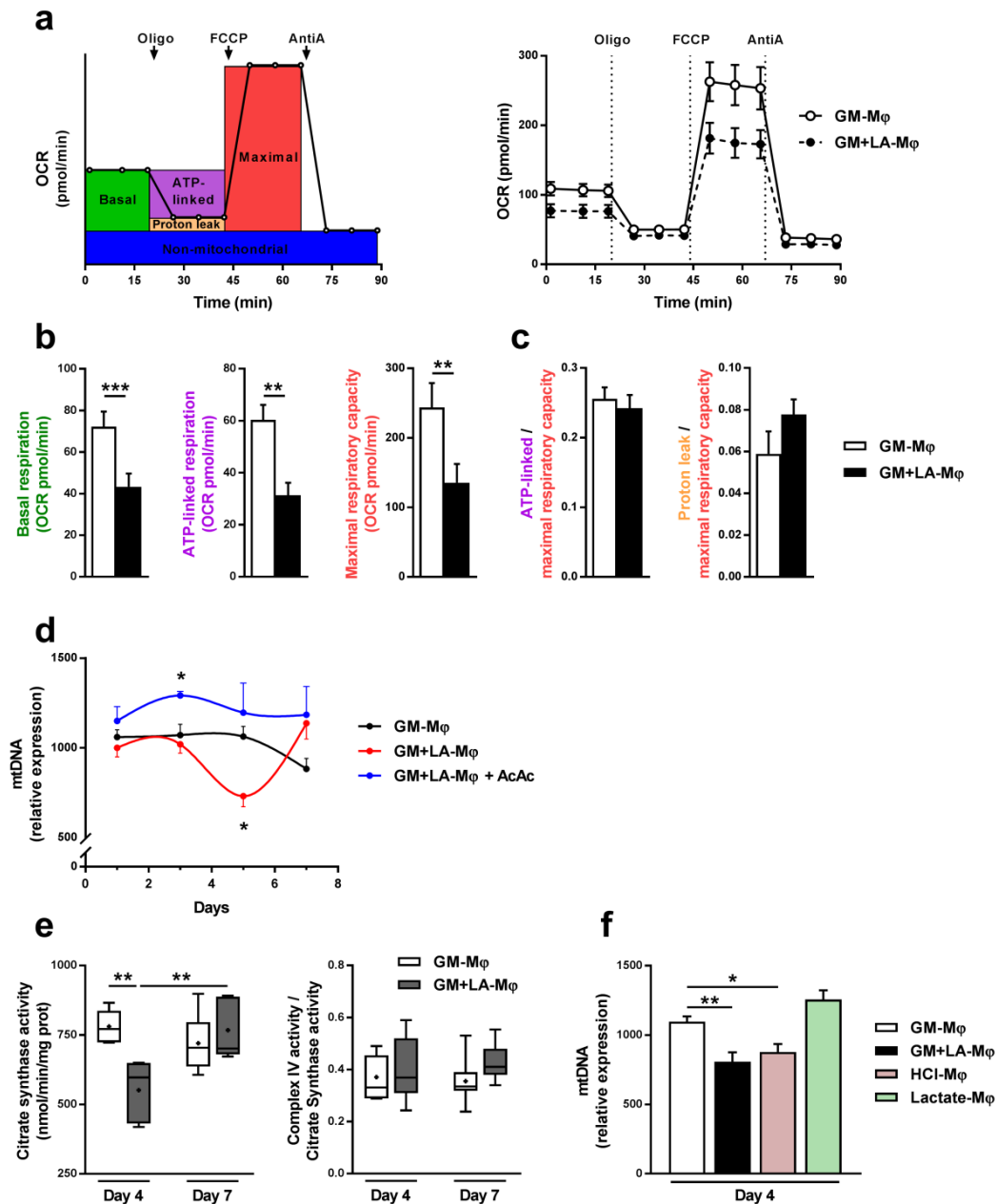


Figure 1. Sustained acidosis affects macrophage mitochondrial mass. Human monocytes were cultured with GM-CSF (GM-Mφ), GM-CSF plus lactic acid (GM+LA-Mφ), GM-CSF plus lactate (Lactate-Mφ) or under acidosis (HCl-Mφ), with or without acetoacetate (AcAc). **a-c**, Monitoring of OCR profiles in day 4 macrophages ($n=7$). **a**, OCR was measured before and after the sequential addition of oligomycin (oligo), carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) and antimycin A (AntiA). Basal OCR, ATP-linked respiration, maximal respiratory capacity and proton-leak respiration were determined as described in the

Materials and Methods section. **b.** Metabolic parameters obtained from OCR profiling. **c.** ATP-linked respiration/maximal respiratory capacity (ATP-linked/maximal) and proton leak/maximal respiratory capacity (proton leak / maximal) ratios were calculated. **d.** Quantification of mitochondrial DNA (mtDNA) by qPCR from day 1 to day 7 ($n=10$). **e.** Citrate synthase activity and complex IV/citrate synthase ratio on days 4 and 7 ($n=4$). **f.** mtDNA quantified on day 4 in GM-M ϕ , GM+LA-M ϕ , HCl-M ϕ and Lactate-M ϕ ($n=4$). **a-f.** Mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ (Student's t -test).

The expression of genes involved in mitochondrial biogenesis is unaffected by lactic acidosis. Mitochondria undergo constant remodeling to maintain correct function. A decrease in mitochondrial mass may therefore result from a decrease in mitochondrial biogenesis and/or an increase in mitophagy (selective removal of dysfunctional mitochondria by the autophagic machinery)^{16,17}. We investigated the process affected by LA, by first analyzing the impact of LA on the expression of the genes encoding mitochondrial transcription factor A (TFAM) and NF-E2 factor 2 (NRF2), both of which are involved in mitochondrial biogenesis. The expression of these genes was not significantly different between GM+LA-M ϕ and GM-M ϕ , whatever the time-point analyzed (Fig. 2a). The expression of both genes tended to increase in day 7 GM+LA-M ϕ (Fig. 2a), consistent with a restoration of the mitochondrial mass (Fig. 1d&e). These results suggest that the decrease in mitochondrial mass in GM+LA-M ϕ does not result from a decrease in mitochondrial biogenesis.

Lactic acidosis induces mitochondrial dysfunction. Mitochondrial depolarization to a dysfunctional level below a certain membrane potential is a prerequisite for mitophagy¹⁸. We therefore evaluated the presence of dysfunctional mitochondria displaying a loss of

mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in GM-M ϕ and GM-LA-M ϕ . We distinguished between respiring mitochondria and dysfunctional mitochondria, through a combination of staining with MitoTracker Green (total $\Delta\psi_m$ -independent mitochondrial content dye) and MitoTracker Deep Red ($\Delta\psi_m$ -dependent mitochondrial dye, suitable for use in an acidic medium)¹⁹⁻²¹. We observed a massive accumulation of depolarized mitochondria (MitoTracker Green^{high} MitoTracker Deep Red^{low}) in GM-LA-M ϕ , peaking on day 3 (Fig. 2b).

Fission events, which segregate dysfunctional mitochondria and generate smaller mitochondria, are a prerequisite for the elimination of dysfunctional mitochondria by mitophagy²². Confocal microscopy revealed changes in the organization of the mitochondrial network architecture in GM-LA-M ϕ relative to GM-M ϕ , with higher values for the morphological form factor (Fig. 2c). However, the mitochondria in GM-M ϕ were almost dot-like (form factor value close to 1). As such, mitochondrial budding during fission would result in higher form factor values that could be misinterpreted as a filamentous network. Transmission electron microscopy (TEM) revealed that mean mitochondrial size was smaller in GM-LA-M ϕ than in GM-M ϕ , with a shift in the entire distribution towards smaller sizes (Fig. 2d). These modifications of the mitochondrial network, at the micro- and nanoscale, are entirely consistent with fragmentation of the mitochondrial network and mitophagy¹⁸.

Thus, prolonged acidosis induces the depolarization of mitochondria in macrophages, resulting in a fragmented mitochondrial network.

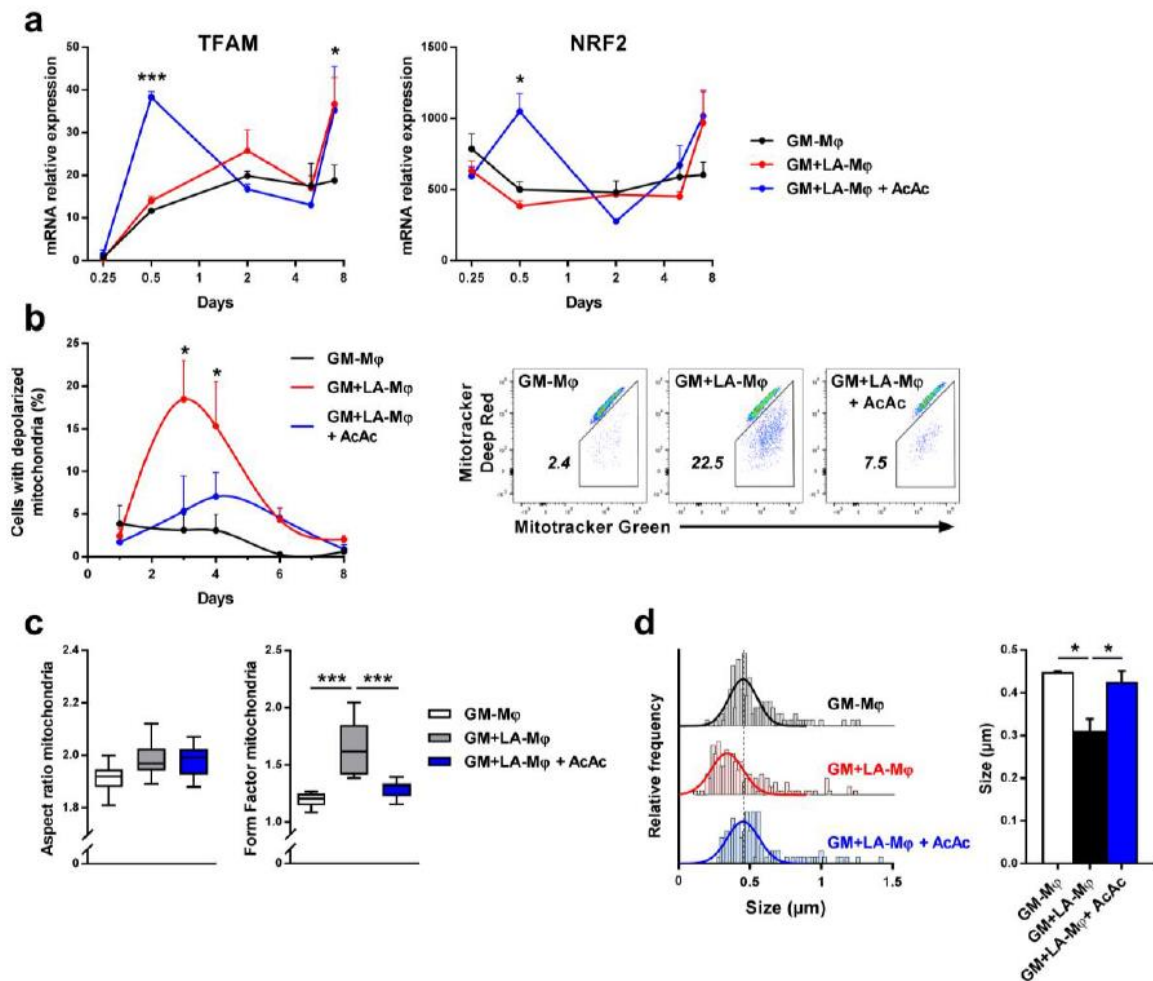


Figure 2. Lactic acidosis induces mitochondrial remodeling. Monocytes were cultured with GM-CSF (GM-Mφ; black) or with GM-CSF plus LA, without (GM+LA-Mφ; red) or with (GM+LA-Mφ + AcAc; blue) 5 mM acetoacetate. **a.** Analysis of TFAM and NRF2 mRNA levels by RT-qPCR at the indicated time points ($n=5$). **b.** Left panel, mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) determined by flow cytometry (details in Materials and Methods); right panel, representative dot plots on day 3 (1 of 5). **c.** Morphological descriptors of the mitochondrial network on day 3. **d.** Size of mitochondria measured on TEM micrographs (100-150 cells per condition) on day 3. Left panel, representative frequency histograms; right panel, compilation of the results ($n=3$). **a-d.** Mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ (Student's t -test).

The autophagic flux in macrophages is enhanced during lactic acidosis. Mitophagy is the selective removal of dysfunctional mitochondria by the autophagic machinery. More precisely, dysfunctional mitochondria are engulfed in autophagosomes, which then fuse with lysosomes, leading to the degradation of the contents of the resulting phagolysosome. We hypothesized that autophagic activity increases in macrophages during lactic acidosis. The number of autophagosomes in the cytoplasm of GM-M ϕ and GM-LA-M ϕ was determined by TEM, a standard method for monitoring autophagy and mitophagy²³. On day 3, GM-LA-M ϕ contained larger numbers of autophagosomes than GM-M ϕ (Fig. 3a&b).

For molecular confirmation of the enhanced autophagic activity in GM-LA-M ϕ , we analyzed levels of the autophagosome-associated protein LC3-II, in the presence of bafilomycin A1 (BafA1), an inhibitor of the vacuolar H⁺ ATPase that prevents lysosomal acidification and interferes with autophagosome/LC3-II degradation²⁴. We found that LC3-II/LC3-I and LC3-II/ β -actin ratios were significantly higher in GM+LA-M ϕ than in GM-M ϕ (Fig. 3c), confirming the presence of a large number of mature autophagosomes in GM+LA-M ϕ . The expression of p62, which binds LC3 directly and is degraded by autophagy, also decreased strongly in GM+LA-M ϕ , and this decrease was limited by BafA1, demonstrating that the autophagic flux was functional in GM+LA-M ϕ (Fig. 3d, upper panel). In addition, consistent with enhanced autophagic activity, levels of the mRNAs encoding ATG5, p62, LC3B, HMOX1 and BNIP3L1, all involved in autophagy²⁵, were transiently upregulated in GM+LA-M ϕ relative to GM-M ϕ , peaking at 12 h (Fig. 3e). These observations ruled out the possibility of the increase in autophagosome numbers in GM+LA-M ϕ being due to accumulation as a result of defective elimination. As previously reported²⁶, monocytes differentiated in the

presence of GM-CSF displayed a discrete increase in ATG5 and p62 mRNA levels (Fig. 3e). In conclusion, autophagic flux is functional, and exacerbated in macrophages under lactic acidosis conditions.

Macrophages rely on autophagy to survive during lactic acidosis

We therefore hypothesized that monocytes/macrophages use autophagy to survive during lactic acidosis. We used salinomycin and BafA1, two autophagy inhibitors shown to be active under acidic conditions^{27–29}, to test this hypothesis. Incubation with salinomycin or BafA1 for 24 h significantly decrease the survival of day 3 GM+LA-Mφ (Fig. 3f), demonstrating that Mφ rely on autophagy to survive during lactic acidosis. Autophagy therefore appears to be an adaptive protective response enabling macrophages to survive in an acidic microenvironment.

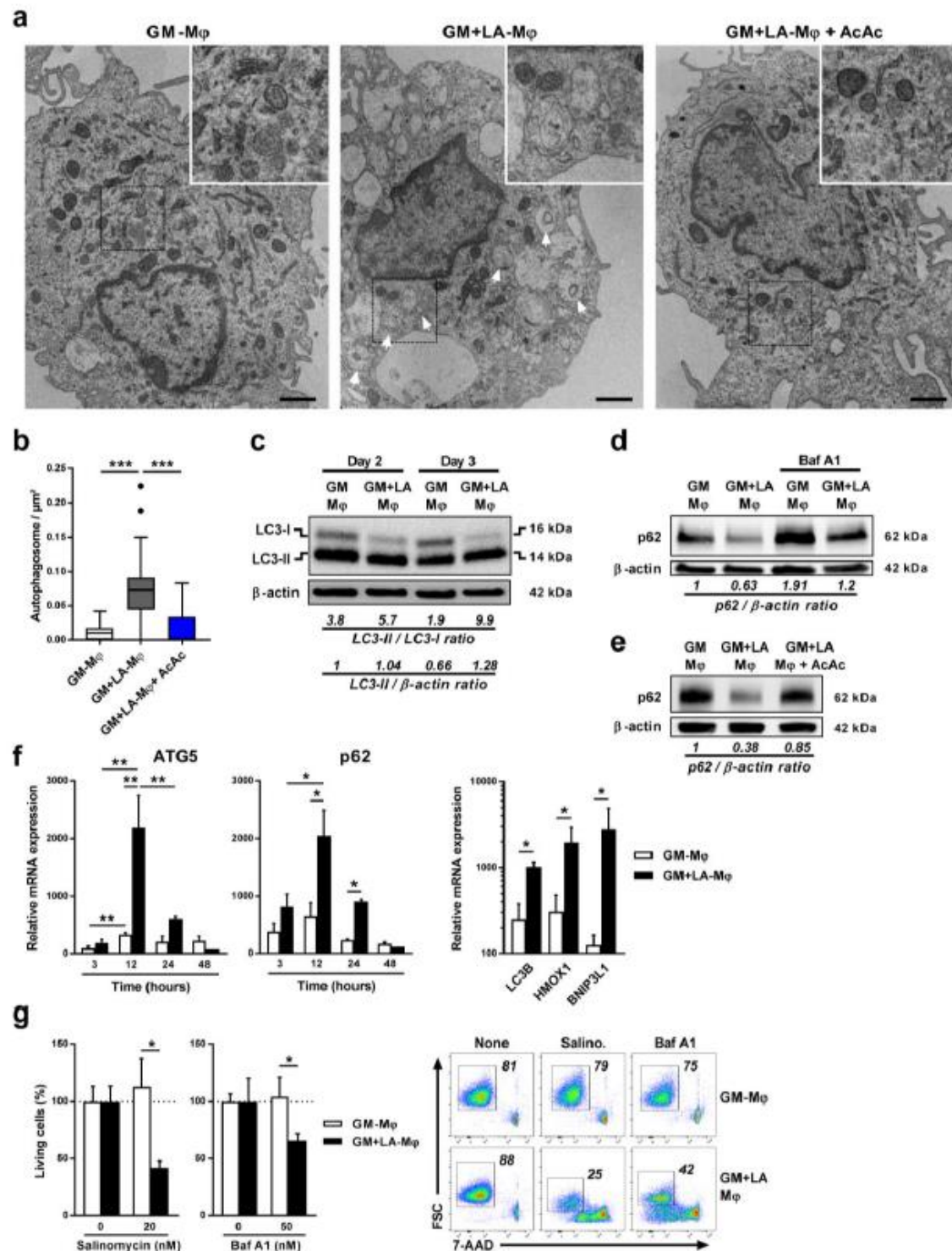


Figure 3. Human macrophages display an upregulation of autophagic flux during lactic acidosis. **a.** Representative TEM micrographs of the indicated M ϕ subsets; arrows, autophagosomes; size bar, 1 μm (upper panel) on day 3. **b.** Quantification of autophagic

vesicles per cell; results are shown in Tukey's box and whisker plots for 30 cells per experimental condition on day 3 (b). **c-e**. Western blot analysis of LC3-I, LC3-II (c), p62 (d,e) and β -actin (c-e) in day 3 M ϕ , in the presence or absence of BafA1 or AcAc. The LC3-II/LC3-I, LC3-II/ β -actin and p62/ β -actin band intensity ratios are indicated. The results shown are from one experiment representative of three performed. **f**. Levels of ATG5, p62, LC3B, HMOX1 and BNIP3L1 mRNA, assessed by RT-qPCR at the indicated time points (left panel) and at 12 h (right panel). **g**. Day 2 M ϕ were exposed to salinomycin or BafA1 for 24 h, and cell viability was evaluated by FACS with 7-AAD staining ($n=5$, left panel). Representative dot plots showing 7-AAD staining versus FSC (right panel). **b,f,g**. Mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ (Student's t -test).

Macrophages display metabolic and cellular changes typical of starving cells during lactic acidosis

Self-catabolic autophagy is strongly induced in response to nutrient starvation, to provide energy substrates; cellular material is, therefore sacrificed, to allow ATP production^{30,31}. In lactic acidosis, monocytes/macrophages are dependent on autophagic processes to survive. We therefore hypothesized that they would have characteristics typical of cells able to cope with "starvation", despite the presence of oxygen and nutrients.

We tested this hypothesis, by investigating the impact of lactic acidosis on AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation. Nutrient deficiency depletes cellular ATP supplies, thereby activating AMPK and promoting autophagy^{32,33}. GM+LA-M ϕ displayed an early increase in AMPK Thr172 phosphorylation (Fig. 4a). Lactic acidosis also upregulated AMPK expression in macrophages (Fig. 4a), as reported for melanoma cells under similar conditions³⁴.

For confirmation of this observation, we analyzed the impact of lactic acidosis on intracellular levels of acetyl-coenzyme A (AcCoA), a major integrator of nutritional status at the crossroads of fat, carbohydrate and protein catabolism³⁵. The decrease in intracellular AcCoA levels induced by nutrient deficiency triggers autophagy^{35,36}. AcCoA levels were lower in GM+LA-M ϕ than in GM-M ϕ , with a trough observed at day 3 (Fig. 4b). Thus, myeloid cells subjected to lactic acidosis have characteristics similar to those of starving cells.

Finally, GM+LA-M ϕ (Fig. 4c-e) and HCl-M ϕ (Fig. 4d) cells were significantly smaller than GM-M ϕ , with the smallest cell sizes recorded on day 3 and a trend towards cell size normalization by day 7 (Fig. 4e). Decreases in cell size are generally considered to be a biophysical change occurring under stress conditions, such as nutrient deprivation, enabling cells to minimize energy demand and expenditure³⁷. Surprisingly, such changes have rarely been associated with autophagy³⁸. Thus, monocytes/macrophages under lactic acidosis conditions display metabolic and morphological changes typical of starving cells, despite the presence of oxygen and nutrients, in a process called pseudostarvation.

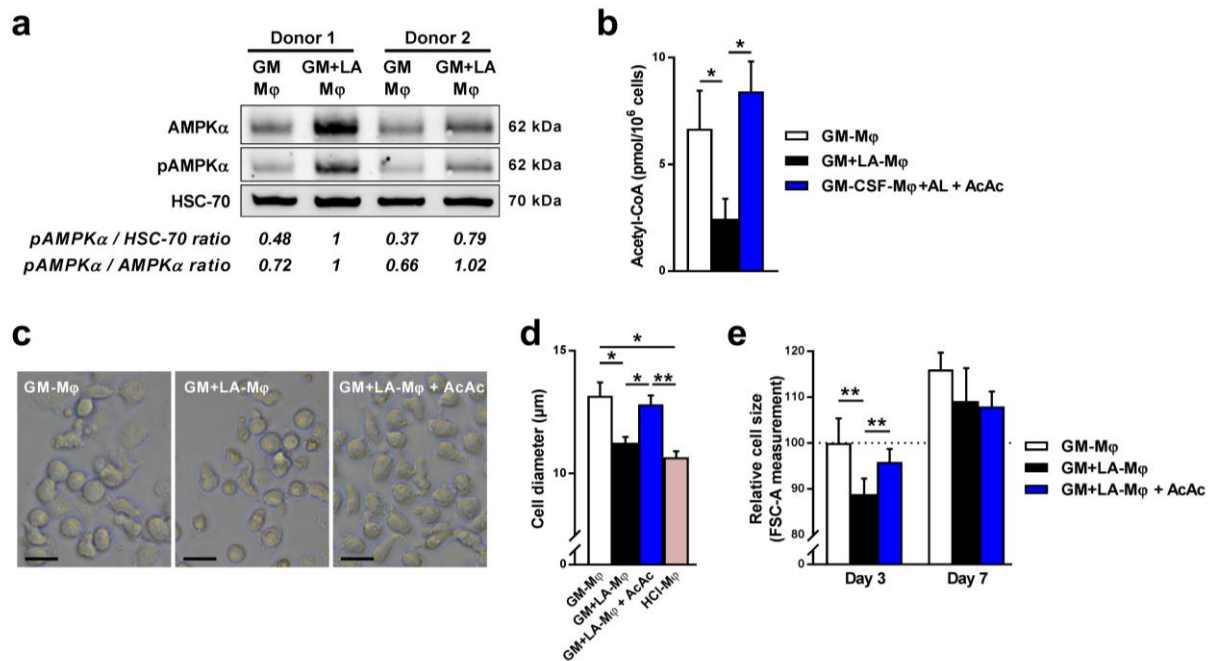


Figure 4. Macrophages in conditions of lactic acidosis have characteristics typical of starving cells. Monocytes were exposed to GM-CSF (GM-Mφ), GM-CSF plus LA without (GM+LA-Mφ) or with acetoacetate (AcAc) (GM+LA-Mφ + AcAc) or to acidosis (12.35 mM HCl, pH=6.5, HCl-Mφ). **a.** Levels of total AMPKα, AMPKα phosphorylated on Thr172 (pAMPKα) and HSC-70 were analyzed by western blotting at 6 h. The results obtained for two of four donors are shown; the values correspond to pAMPKα/HSC-70 and pAMPKα/AMPKα band intensity ratios. **b.** Intracellular acetyl-CoA levels determined on day 3 (*n*=4). **c.** Photomicrographs of the Mφ population on day 3; scale bar, 10 μm. **d,e.** Cell size was determined on day 3 (**d,e**) and day 7 (**e**), by determining the mean of diameter of Mφ in each population (**e**, *n*=3) or relative cell size by flow cytometry with the FSC-A parameter (**f**, *n*=7). **b,d,e.** Mean ± SEM. **p*<0.05; ***p*<0.01 (Student's *t*-test).

Lactic acidosis greatly decreases nutrient uptake. We investigated the mechanism underlying pseudostarvation in GM+LA-Mφ, by comparing the ability of monocytes/macrophages to consume nutrients in the presence and absence of LA, by quantifying glucose, lactate and amino acids in cell culture supernatants during differentiation.

Under acidosis conditions, monocytes treated with LA or HCl had low glycolysis rates. They lost their capacity to absorb glucose early in differentiation, and this defect was maintained until day 7 (Fig. 5a), despite the maintenance of membrane levels of the glucose transporters Glut1, Glut3 and Glut5 (Supplemental Fig. S2). Accordingly, GM+LA-Mφ and HCl-Mφ released only small amounts of lactate (Fig. 5b). Following the exposure of cells to LA, extracellular lactate concentrations reflected the balance between LA absorption and production, and a trend towards lactate consumption was observed on day 3 in GM+LA-Mφ (Fig. 5b).

A low extracellular pH (pHe) has been shown to lead to acidification of the cytosolic compartment of tumor cells^{34,39}, thereby inhibiting glycolysis^{40,41}. Indeed, changes in intracellular pH (pHi) affect intracellular gradients of protons and membrane symporters and may modify the activities of many enzymes^{42,43}. We therefore evaluated the impact of extracellular acidosis on the pHi of monocytes (Fig. 5e). The pHi of monocytes exposed to a pHe of 7.4 remained stable over time, but the exposure of monocytes to a pHe of 6.5 led to a sharp drop in pHi, followed by a return to normal values on day 1 (Fig. 5e). Thus, under lactic acidosis conditions, monocytes/macrophages display a strong but transient decrease in pHi⁶. Finally, a strong early decrease in the uptake of amino-acids and glutamine was also observed in GM+LA-Mφ (Fig. 5c&d). In conclusion, these observations indicate that, in an acidic environment, monocytes/macrophages reduce their nutrient consumption, entering a state of pseudostarvation in which they rely on self-catabolism to survive.

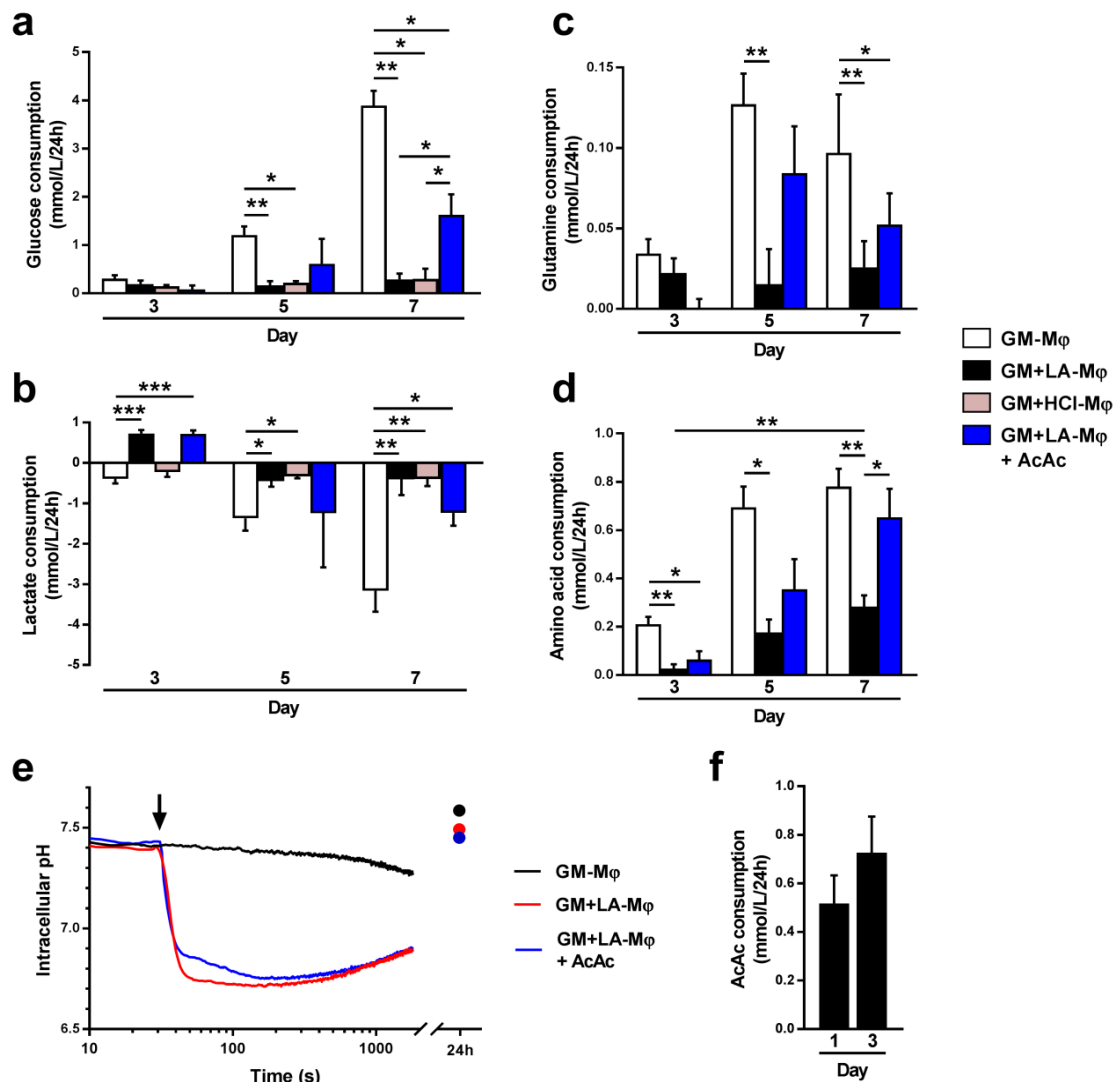


Figure 5. Acetoacetate prevents acidosis-induced pseudostarvation. a,b,d,e. Glucose (a), lactate (b), glutamine (c), and amino acids (d) were quantified on days 3, 5 and 7 in cell culture supernatants of GM-Mφ, GM+LA-Mφ, GM+LA-Mφ + AcAc and HCl-Mφ. Results are expressed as consumption or production, in mmol/L/24 h, with positive values for consumption and negative values for production ($n=5$). c. Intracellular pH was measured by flow cytometry with the SNARF probe. GM-Mφ were loaded with the SNARF probe and analyzed for 30 seconds before the addition (arrow) of 10 mM lactic acid (GM+LA-Mφ) with or without 5 mM acetoacetate (GM+LA-Mφ + AcAc). Acquisition was then prolonged for an additional 30 minutes. Probe loading and acquisition were repeated at 24 h. Representative results from one of three independent experiments are shown. f. Acetoacetate (AcAc) was

quantified on days 1 and 3 in GM+LA-M ϕ + AcAc culture supernatants ($n=5$). **a-f.** Mean $\pm$ SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ (Student's t -test).

AcAc prevents acidosis-induced pseudostarvation and mitophagy

The ketone bodies acetoacetate (AcAc) and β -hydroxybutyrate (β -OHB) are vital alternative metabolic fuel sources for cells during nutrient starvation. In fasting periods, in which carbohydrate availability decrease and fatty-acid availability increase, ketone bodies are synthesized *de novo* within liver mitochondria, via fatty acid β -oxidation⁴⁴. They are then catabolized in extrahepatic mitochondria, and converted into AcCoA through reactions that do not require ATP⁴⁴. We investigated the possible use of ketone bodies by cells, as an alternative fuel to bypass acidosis-induced pseudostarvation.

Monocytes were differentiated into macrophages under lactic acidosis conditions, in the presence or absence of AcAc (GM+LA-M ϕ + AcAc). Despite the presence of LA, the mtDNA content of GM+LA-M ϕ + AcAc did not decrease during the differentiation process as observed in the presence of LA alone. Instead, it even increased slightly by day 2 (Fig. 1d), and this increase was accompanied by an early upregulation of the expression of genes involved in mitochondrial biogenesis relative to GM+LA-M ϕ (Fig. 2a). In parallel, GM+LA-M ϕ + AcAc displayed no mitochondrial depolarization (Fig. 2b). Instead, AcAc appeared to protect the mitochondrial network architecture, as shown by the similarity in morphological descriptors and mean mitochondrial size (Fig. 2c-d) between these cells and GM-M ϕ . In addition, autophagy, as assessed by TEM (Fig. 3a&b) or molecularly (Fig. 3d, lower panel), was not upregulated in day 3 GM+LA-M ϕ + AcAc relative to GM-M ϕ . GM+LA-M ϕ may no

longer need to use autophagy in the presence of AcAc, because myeloid cells in an acidic medium not only consume AcAc (Fig. 5f), but also retain a partial capacity to take up glucose and amino acids and to produce lactate (Fig. 5a-d). Accordingly, in the presence of LA and AcAc, no effect was observed on the various mitochondrial parameters, intracellular AcCoA levels (Fig. 4b), or cell size (Fig. 4c-e). However, AcAc did not prevent the decrease in pH_i induced by extracellular acidosis (Fig. 5e). Finally, we observed that β -OHB did not protect macrophages from acidosis-induced mitochondrial depolarization (data not presented). Consistently, and as reported for murine macrophages⁴⁵, human macrophages did not produce the mRNA encoding BDH1, the enzyme responsible for oxidizing β -OHB to AcAc (data not presented).

Thus, by maintaining mitochondrial integrity and cellular metabolism during acidosis, AcAc appears to act as an alternative fuel, thereby preventing cellular dysfunction due to acidic stress and increasing tissue resistance to acidosis.

Acetoacetate does not affect the phenotype of macrophages generated under lactic acidosis conditions

We recently showed that GM+LA-M ϕ have an atypical inflammatory (TNF α ^{high} IL-1 β ^{high} IL-6^{high} IL-12^{neg}) and trophic (OSM^{high} VEGF^{high}) phenotype (Fig. 6). Consistent with the conservation of cytokine production by these cells, no endoplasmic reticulum stress was detected in GM+LA-M ϕ by TEM (data not shown). Metabolic changes can influence the phenotype of immune cells⁴⁶. We therefore analyzed the impact of AcAc on the phenotype of GM+LA-M ϕ further. Human macrophages require stimulation to reveal their phenotype. We thus compared the cytokine profiles of LPS-stimulated cells. With the exception of IL-12p70

that remained undetectable, GM+LA-M ϕ + AcAc produced higher amounts of cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-6, OSM and VEGF-A) than GM+LA-M ϕ (Fig. 6).

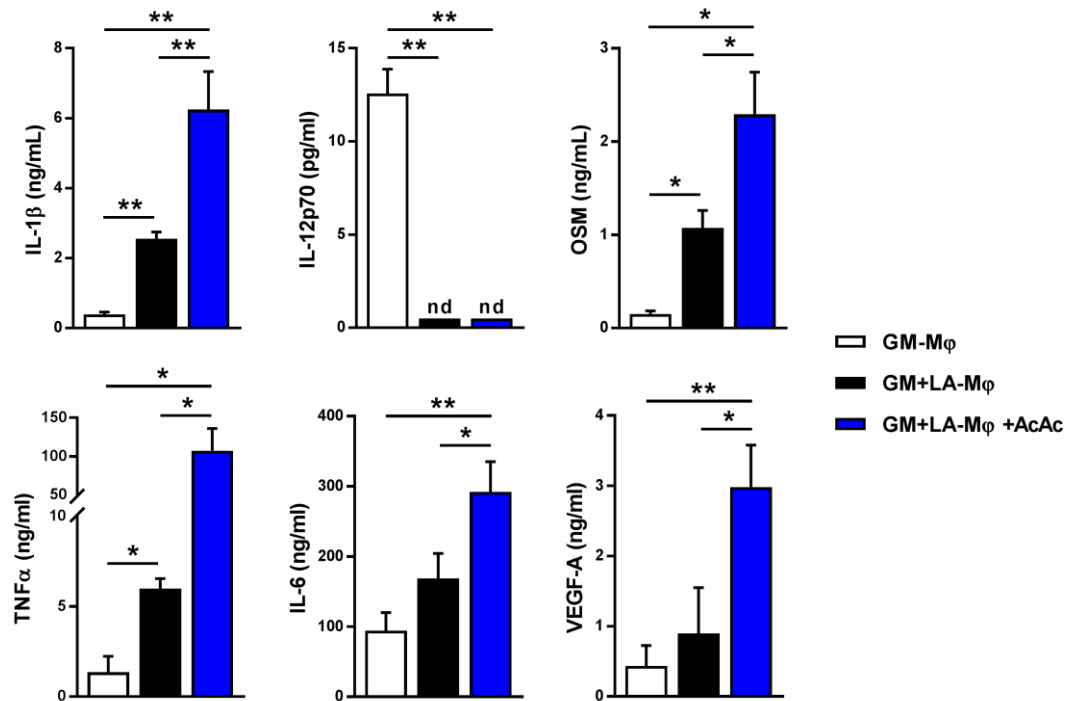


Figure 6. Impact of AcAc on the phenotype of GM+LA-M ϕ . Day 5 GM-M ϕ , GM+LA-M ϕ and GM+LA-M ϕ + AcAc were stimulated for 16 h with LPS. Cytokines were quantified by ELISA in the supernatants. Results are expressed as means $\pm$ SEM, $n=5$. nd, not detectable, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ (Student's t -test).

Discussion

Lactic acidosis is a characteristic of injured tissues, such as areas of wound repair and solid tumor microenvironments^{1,2}. The metabolic strategies enabling tumor cells to survive in acidic environments have been widely studied⁴⁷, but little is known about the ability of human monocytes/macrophages to cope with these hostile conditions. We show here that the prolonged exposure of macrophages to lactic acidosis leads to mitochondrial depolarization and a large decrease in nutrient consumption, highlighting the essential role of autophagy in cell survival (Fig. 7). We also report that the ketone body acetoacetate can fuel myeloid cells during acidosis, maintaining cellular energy metabolism and mitochondrial integrity and function (Fig. 7). Our results demonstrate that (i) prolonged acidosis alters macrophage mitochondria and metabolism and (ii) acetoacetate, by providing the cell with an alternative source of fuel and maintaining mitochondrial integrity, improves cell and tissue tolerance to acidic stress.

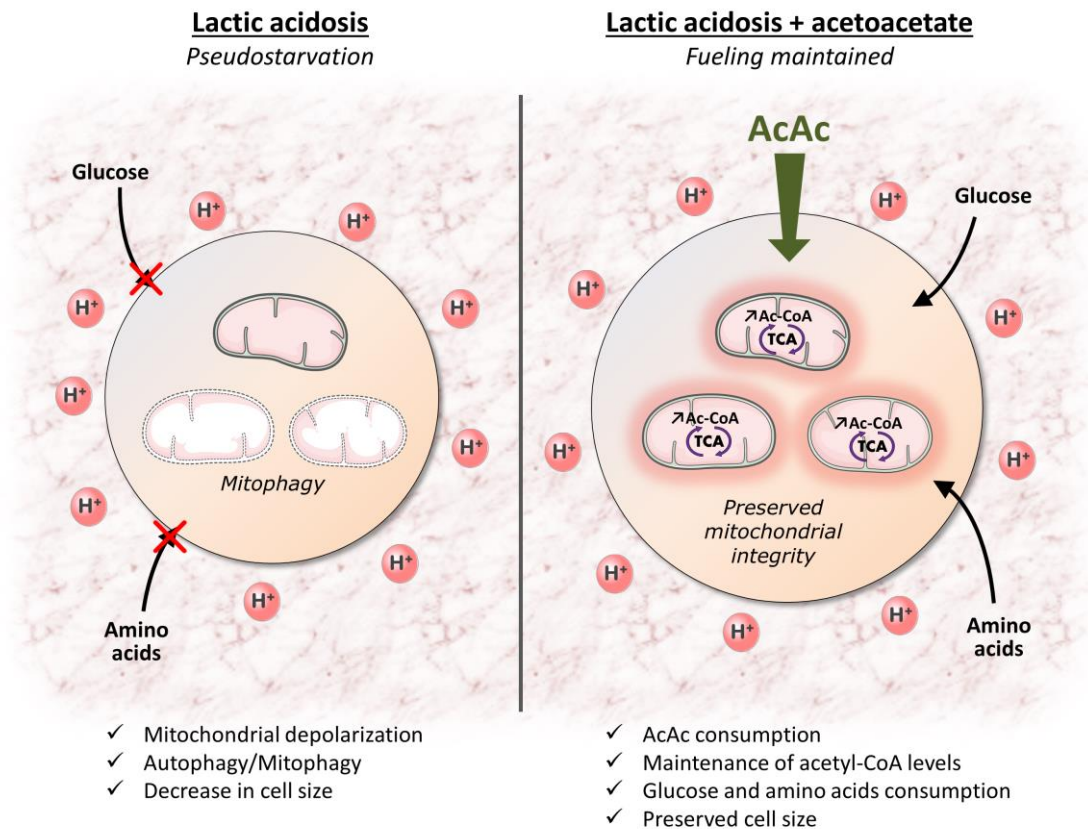


Figure 7. Schematic representation of the protective effects of AcAc on macrophages under lactic acidosis conditions. High levels of cell proliferation and/or tissue hypoxia lead to the extracellular accumulation of LA and acidification. Macrophages are then subjected to metabolic stress (they stop consuming nutrients, their cell size/diameter, and intracellular levels of AcCoA decreases) and display mitochondrial dysfunction (mitochondrial membrane depolarization, decrease in mitochondrial mass), but they survive through autophagy. AcAc acts as an alternative fuel and protects the mitochondria of myeloid cells exposed to acidosis, thereby preventing pseudostarvation and the need for autophagy to survive.

In conditions of extracellular acidosis, monocytes/macrophages enter a pseudostarvation state, despite the presence of nutrients and oxygen. Tumor cells have also been shown to respond to acidic microenvironments by entering a pseudostarvation phase³² associated with a large

decrease in glucose uptake, glycolysis and amino-acid consumption⁴¹. As in myeloid cells, extracellular acidification also resulted in a steep drop in pHi in tumor cells^{34,48–50}. It has been suggested that this decrease in pHi inhibits the activity of enzymes involved in glycolysis⁴¹ and acidosis-sensitive glutamine pumps^{51,52}.

Sustained autophagy has been reported to be essential for tumor cell survival in acidic microenvironments^{1,27}. This has led to the suggestion that drugs that inhibit autophagy could be used to treat cancers. In particular, when subjected to acidic stress, melanoma cells display a pseudostarvation response and rely on autophagy to survive²⁷. We show here that non-proliferating human myeloid cells also rely on autophagy to survive in an acidic environment. This autophagic phase was transient and the macrophages gradually recovered at least part of their capacity to take up amino acids. Glutamine and leucine inhibit autophagy^{53–55}, potentially explaining why extracellular acidosis-induced autophagy is transient and does not cause a metabolic crisis or cell death.

AcAc and β -OHB are the main ketone bodies present in the body. They serve as alternative fuels for the mitochondria of extrahepatic cells in cases of starvation or carbohydrate restriction⁴⁴. The oxidation of AcAc into AcCoA is mediated by a CoA transferase (SCOT) that generates AcAc-CoA, followed by thiolases, yielding two molecules of AcCoA, which enter the TCA cycle (Fig. 8)⁴⁴. AcAc oxidation does not require ATP. AcAc oxidative flux occurs due to mass action: an abundant supply of AcAc and the rapid consumption of AcCoA via citrate synthase in the TCA cycle favor AcAc-CoA formation by OXCT1 (Fig. 8)⁴⁴. By contrast, hexokinase and acyl-CoA synthetases require ATP to generate and process AcCoA from glucose and fatty acids, respectively. This may explain why cells continue to be able to

consume AcAc during lactic acidosis, whereas they are unable to metabolize glucose and amino acids. Finally, we observed that β -OHB did not protect macrophages from pseudostarvation and mitochondrial membrane depolarization during lactic acidosis (data not presented). One of the reasons for which β -OHB was unable to prevent pseudostarvation in M ϕ exposed to lactic acidosis may be that human and murine monocytes and macrophages do not express the gene encoding BDH1, the enzyme responsible for converting β -OHB into AcAc⁴⁵. Thus, AcAc appears to be a unique substrate able to protect myeloid cells from low extracellular pH-induced metabolic stress.

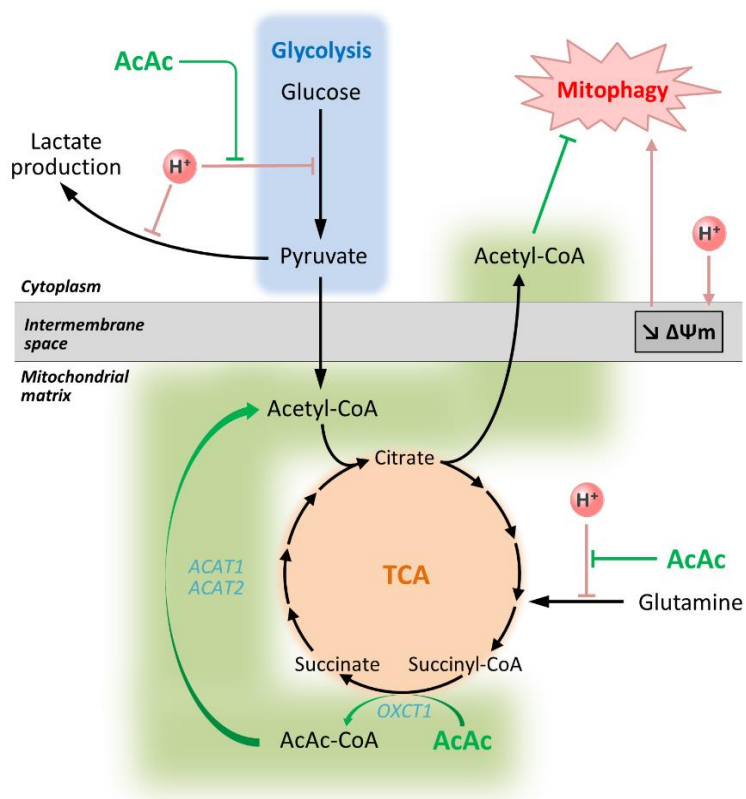


Figure 8. Schematic representation of the impact of AcAc on the macrophage metabolism during acidosis. Human macrophages subjected to lactic acidosis display a large decrease in nutrient uptake, low levels of intracellular acetyl-CoA, and a depolarization of mitochondria, rendering them dependent on autophagy to survive. AcAc (which is assimilated

into AcAc-CoA via OXCT1 and acetyl-CoA via ACAT1 and ACAT2) can serve as an alternative fuel for macrophages subjected to lactic acidosis. AcAc maintains the ability of these cells to take up glucose and amino acids, and normal levels of acetyl-CoA, thereby ensuring an adequate supply of substrates, maintaining mitochondrial function and integrity, and preventing starvation-induced autophagy.

The balance between energy demand and nutrient supply is regulated by mitochondrial dynamics⁵⁶. Nutrient starvation generally leads to an inhibition of mitochondrial fission and mitochondrial elongation, due to unopposed fusion. This elongation prevents the removal of mitochondria by mitophagy and increases the capacity for ATP synthesis, thereby satisfying the demand for ATP during periods of limited nutrient availability⁵⁶. By contrast, despite displaying the biochemical and morphological characteristics of starving cells, macrophages subjected to acidosis have depolarized mitochondria, with higher rates of fission events (as shown by the decrease in mitochondrial size and the presence of a fragmented mitochondrial network). It is tempting to speculate that, under acidosis conditions, the increase in cytosolic proton concentration leading to the decrease in pHi also affects mitochondrial membrane potential. Similarly, a decrease in pHi has been reported to trigger autophagy and mitophagy^{34,48–50}. This decrease is transient, with pHi returning to values similar to those in cells maintained in a standard medium after 24 hours, suggesting that the pumps and proteins controlling pHi⁶ are very effective in human myeloid cells. In addition to having a direct effect on mitochondrial membrane potential, this decrease in pHi also inhibits glycolysis and amino-acid use. This inhibition of the catabolic pathways responsible for supplying the TCA cycle and then the mitochondrial complexes with reducing equivalents (NADH, H⁺, FADH₂) may decrease the ability of the respiratory chain to maintain mitochondrial membrane potential.

Importantly, even though AcAc prevents acidosis-induced pseudostarvation, mitochondrial depolarization and autophagy, it does not prevent the drop in pHi induced by acidosis. We therefore suggest that AcAc, by feeding the TCA cycle and boosting mitochondrial respiration and biogenesis, prevents the depolarization of the mitochondrial membrane induced by the fall in pHi. In conclusion, AcAc protects cells from the metabolic stress induced by acidosis (a) by providing them with fuel for the maintenance of their energy metabolism and (b) by ensuring mitochondrial integrity and function.

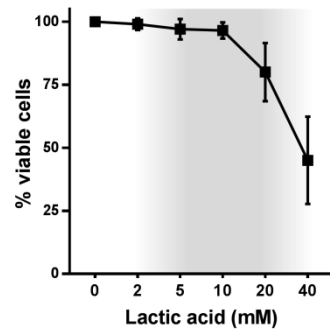
Many clinical situations in medicine are associated with tissue acidosis (areas of wound repair, solid tumor microenvironments) or systemic acidosis (septic shock). Mitochondrial dysfunction (mitochondrial depolarization, decreases in mitochondrial respiration and ATP production) occurs early in sepsis, and its persistence contributes to organ failure and a poor clinical prognosis⁵⁷⁻⁵⁹. The cause of the mitochondrial dysfunction in sepsis remains undetermined, but a role for inflammatory mediators has been suggested⁶⁰. Sepsis is also associated with an increase in lactate production (with low levels of clearance by gluconeogenesis), which can lead to systemic acidosis ($\text{pH} < 7.38$) and is correlated with disease severity, morbidity and mortality. Our findings for human myeloid cells chronically exposed to LA strongly suggest that acidosis makes a major contribution to the mitochondrial dysfunctions observed in situations in which extracellular acidosis occurs, such as sepsis.

Signs of cell starvation are observed during sepsis, together with a decrease in the catabolism of glucose, fatty acids and amino acids, and hyperglycemia⁶⁰. The observation that myeloid cells in fail to take up nutrients during acidosis may, therefore, help to explain some of the

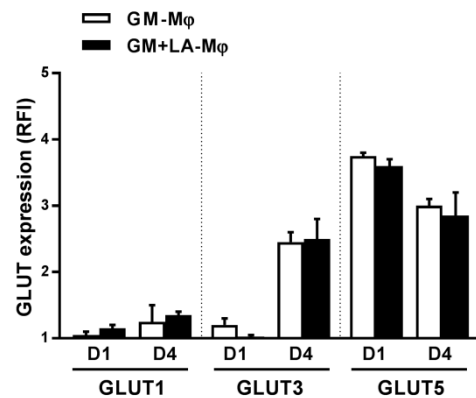
metabolic changes associated with sepsis. Indeed, supplementation with glucose or nutrients has recently been shown to be harmful in mouse models of bacterial sepsis, as such supplementation decreases host tolerance and increases host mortality⁶¹.

Various treatments for protecting mitochondria during sepsis have been proposed, none of which are really efficient⁶². However, fasting and ketogenesis appear to be essential to animal survival and increase the ability of tissues to tolerate damage due to inflammation⁶¹. We also show, in our *in vitro* study, that AcAc protects mitochondria by enabling them to remain metabolically active in an acidic environment. Finally, as sepsis patients display only low levels of ketogenesis⁶³, AcAc is potentially a candidate metabolite of choice for increasing cell tolerance to acidic stress, thereby preventing organ dysfunction and failure.

In conclusion, we report that non-proliferating human monocytes/macrophages cope with an acidic microenvironment through a transient phase of autophagy and mitophagy, explaining their survival and ability to perform their functions in injured tissues and tumor lesions. We identify AcAc as a unique molecule that supports cellular metabolism during extracellular acidosis, thereby maintaining mitochondrial integrity and preventing the need for a transient, but deleterious autophagic process. These results highlight the potential role of AcAc as a natural metabolite capable of protecting cells and enhancing host tolerance in pathological situations associated with acute or chronic acidosis.



Supplemental figure S1. Macrophage viability in the presence of lactic acid. Human monocytes were cultured with GM-CSF and the indicated concentrations of lactic acid and cell viability was determined by flow cytometry at day 5. Results are expressed as a percentage of viable cells (n=5, mean $\pm$ SEM); shaded area, range of lactic acid concentrations in solid tumors (Vander Heiden MG et al. *Science* 2009;324:1029-33).



Supplemental figure S2. Lactic acid does not modulate the expression of GLUT by macrophages. Human monocytes were cultured with GM-CSF in the absence (GM-Mφ) or presence (GM+LA-Mφ) of 10 mM lactic acid. The expression of GLUT1, GLUT3 and GLUT5 was assessed by flow cytometry at day 1 and day 4. Results are expressed as RFI values (n=5, mean $\pm$ SEM).

Methods

Monocyte isolation and macrophage generation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy human volunteers (Blood collection center, Angers, France; agreement ANG-2017-01) by standard density-gradient centrifugation on lymphocyte separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France). CD14⁺ monocytes were then isolated by positive magnetic cell-sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes (1×10^6 cells/mL) were cultured in complete medium (CM) consisting of RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FCS (Eurobio), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all from Lonza) in the presence of 50 ng/mL GM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN) to generate GM-Mφ, or 50 ng/mL GM-CSF plus 10 mM lactic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) resulting in a pH of 6.5 to generate GM+LA-Mφ (lactic acidosis conditioning), or 50 ng/mL GM-CSF plus 12.35 mM HCl to reach a final pH of 6.5 to generate HCl-Mφ (acidosis conditioning), or 50 ng/mL GM-CSF plus 10 mM sodium lactate (Sigma-Aldrich) to generate lactate-Mφ (lactosis conditioning, pH 7.3). In some experiments, 5 mM acetoacetate (AcAc) (Sigma-Aldrich) was added to the differentiation medium.

Measurement of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was assessed by incubating with 10 nM MitoTracker Green and 5 nM MitoTracker DeepRed (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in 1% BSA in PBS at 37°C for 15 min. Cells were washed and incubated with 0.5 µg/mL DAPI to exclude

dead cells. Flow cytometry data were acquired with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed with FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Assessment of cell viability

The polarization of GM-M ϕ and GM+LA-M ϕ was initiated by adding bafilomycin or salinomycin (both from Sigma-Aldrich) to the culture medium at a concentration of 20 nM or 100 nM on day 2 and incubating for 24 h. Cell viability was then assessed by staining with 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Biolegend, San Diego, CA) before flow cytometry analysis. Cultures without bafilomycin or salinomycin were considered to be 100% viable.

Measurement of intracellular pH

Intracellular pH (pHi) was measured by incubating 3×10^5 M ϕ with 500 nM pH-sensitive dye carboxy-SNARF-AM pH-sensitive dye (Life Technologies, Carlsbad, CA) in 1% BSA in PBS at 37°C for 20 min and then performing flow cytometry analysis. We determined pHi as the ratio of fluorescence intensities at two emission wavelengths (585/42 nm and 700/60 nm PMTs). SNARF fluorescence in macrophages was calibrated with a high-potassium buffer (39.6 mM NaCl, 120 mM KCl, 2.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM glucose) at pH values of 6.5 to 8, in the presence of 10 μ M nigericin (Sigma-Aldrich); nigericin exchanges external potassium with internal protons to equilibrate extracellular and intracellular pH.

Analysis of mRNA levels

Cells were lysed in Trizol reagent (Life Technologies), and total RNA was extracted with the RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse-transcribed with the Superscript II

reverse transcriptase (Life Technologies). Levels of mRNA encoding the indicated proteins were then analyzed by subjecting the cDNA obtained by reverse transcription to qPCR. Relative quantification was performed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, with RPS18, EF1A, TBP, RPL13A and PPIA as references. Results are expressed as relative mRNA levels; primer sequences are available upon request.

Oxygen consumption rate (OCR)

We used an XF96 extracellular flux analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) to determine the bioenergetic profile of intact cells. Day-4 cells were used to seed XF96 plates (50×10^3 cells/well) and were allowed to recover for 24 h. Cells were then incubated in bicarbonate-free DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 11 mM glucose, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate, in a CO₂-free incubator for 1 h. Oxygen consumption rate (OCR) was recorded, to assess mitochondrial respiratory activity and glycolytic activity. OCR was recorded in basal conditions, and the cells were then treated sequentially with 2 µg/mL oligomycin, and 3 µM carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) (both from Sigma-Aldrich). Non-mitochondrial respiration (OCR after treatment with 1 µg/mL antimycin A (Sigma-Aldrich)) was subtracted from all OCR measurements. ATP-linked respiration was estimated from the difference between the basal and oligomycin-inhibited respiration rates, and proton-leak respiration was obtained by subtracting non-mitochondrial respiration from the OCR measured after oligomycin treatment. Maximal respiratory capacity was determined as the rate of respiration in the presence of the uncoupler FCCP. Three independent replicates of each measurement were generated, and results were normalized by cell concentration.

Western blot analysis

Levels of LC3-I, LC3-II, p62, β -actin, AMPK α and pAMPK α were evaluated by western blotting. Cells were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). When indicated, cells were treated with 10 mM BafA1, 6 h before lysis. Lysates were centrifuged at $12\,000 \times g$ for 10 min at 4°C to remove cell debris. Proteins (10 μ g/lane) were separated by electrophoresis in a 4-20% polyacrylamide gel (Bio-Rad, Hercules, CA) in reducing conditions, and the resulting bands were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were saturated in TBS/5% BSA/0.1% Tween 20, and then incubated for 16 h at 4°C with polyclonal rabbit anti-LC3 or an anti-phospho-AMPK α (Thr172) antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) or with a mouse anti-p62 Ick ligand antibody (BD Biosciences, San Jose, CA). Protein loading was assessed by probing the membrane with a rabbit anti- β -actin antibody (Abcam). Bound antibodies were detected by incubation with 1 μ g/mL peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (Life Technologies), with the SuperSignal West Femto system (Thermo Fisher Scientific). Genetools software (version 4.01) from Syngene was used to quantify band intensity.

Mitochondrial enzyme activities

The activities of complex IV of the respiratory chain and of citrate synthase were measured as described elsewhere⁶⁴. Briefly, cell pellets (3×10^6 cells) were resuspended in cell buffer (250 mM sucrose, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mg/mL BSA, pH 7.4). They were subjected to a freeze-thaw cycle, and then centrifuged ($15\,000 \times g$, 1 min). The pellet was resuspended in the same volume of cell buffer. For complex IV activity (cytochrome *c* oxidase), GM-M ϕ and GM+LA-M ϕ were resuspended in cell buffer at densities of 1×10^5 cells/mL and 2×10^5

cells/mL, respectively, and 0.05 mM reduced cytochrome C, 1 mg/mL BSA and 0.25 mM laurylmaltoside were added to the reaction mixture. The rate of reduced cytochrome c oxidation was monitored at $\lambda=550$ nm. Citrate synthase activity was measured as follows: the prewarmed reaction mixture (0.15 mM DTNB, 0.5 mM oxaloacetic acid, 0.3 mM acetyl coA, 0.1% (v:v) Triton X100) was added to 2×10^5 M ϕ and the rate of appearance of CoA-SH was measured at $\lambda=412$ nm.

Metabolite quantification

The levels of glucose, glutamine, amino acids and lactate in cell culture supernatants, and of acetyl-CoA in whole-cell lysates were determined, together with the intracellular ADP/ATP ratio, with enzymatic assays (Abcam, Cambridge, UK), according to the manufacturer's instructions. Results are expressed in mmol/L/24 h, with positive values indicating consumption and negative values indicating production. Acetoacetate concentrations were quantified with β -hydroxybutyrate dehydrogenase (3-HBDH) (Roche Applied Science), an enzyme that catalyzes the reversible reduction of acetoacetate to β -hydroxybutyrate in the presence of excess NADH, with the concomitant oxidation of NADH. The progress of the reaction was monitored by measuring the decrease in $A_{340\text{nm}}$ due to the conversion of NADH into NAD. AcAc consumption was determined by subtracting the concentration of AcAc in cell culture supernatants from that in cell-free culture supernatants.

Quantification of mtDNA copy number

Mitochondrial DNA (mtDNA) content was determined by qPCR with primers specific for the ND4 and COX1 genes, and was weighted according to nuclear DNA levels, which were quantified by analyzing β 2-microglobulin, as previously described [65].

Macrophage stimulation and cytokine quantification

Day 5 GM-M ϕ , GM+LA-M ϕ and GM+LA-M ϕ + AcAc were stimulated with 200 ng/mL LPS (Sigma). Cytokines were quantified by ELISA (R&D Systems) in the supernatants after 16 h.

Determination of relative cell size

Cell diameter was determined with the cell size analysis function of the Cellometer Auto T4 cell counter (Nexcelom Biosciences, Lawrence, MA); for each sample ($n=3$), 150 individual cells were measured. Relative cell size was determined by flow cytometry with the FSC-A parameter and the exclusion of non-viable cells by 7-AAD staining. About 5000 individual cells were measured ($n=7$).

Confocal microscopy and image analysis

Cells were first incubated with 150 nM MitoTracker Green (Thermo Fisher Scientific) in CM medium at 37°C for 10 min. The organization of the mitochondrial network was characterized as described by Iannetti et al⁶⁵. Briefly, images were acquired on a Leica SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) and submitted to a routine script in Matlab R2014a (The Mathworks, Natick, CA) for top-hat filtering (7x7 kernel), followed by median filtering (3x3 kernel) and binarization with the Otsu algorithm. Image blobs were then analyzed with the regionprops function of Matlab.

Electron microscopy

We fixed 5×10^6 macrophages by incubation for 16 h at 4°C with 2.5% electron-grade glutaraldehyde (LFD Distribution, Sainte Consorce, France) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4. Samples were then rinsed with 0.1 M phosphate buffer and post-fixed by incubation with 1% osmium tetroxide for 45 min at room temperature. Samples were then dehydrated in graded series of ethanol solutions and finally embedded in Epon at 60°C for 48 h. Embedded samples were cut into 60 nm-thick sections, which were contrast-stained with 3% uranyl acetate in water for 10 min and then observed under a Jeol JEM 1400 transmission electron microscope operating at 120 keV and equipped with a Gatan Orius digital camera. We obtained full cross-sections of macrophages at high resolution by acquiring multiple fields at a magnification of 20,000× and stitching them together in Adobe Photoshop with the Photomerge routine. Stitched images were reviewed and scored by a trained electron microscopist for the presence of autophagy vacuoles. Mitochondrial size was determined by measuring the maximum Feret diameter on TEM images.

Statistics

The results are presented as the mean + SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed with Graphpad PRISM version 7.02 (www.graphpad.com), as described in the figure legends. We used *t*-tests to compare two samples/conditions.

Data availability

The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information files and that all data are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

1. Baldini, N. *et al.* Metabolism and microenvironment in cancer plasticity. *Cancer & Metabolism* **4**, 1 (2016).
2. Sun, S., Li, H., Chen, J. & Qian, Q. Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology (Bethesda)* **32**, 453–463 (2017).
3. Erra Díaz, F., Dantas, E. & Geffner, J. Unravelling the Interplay between Extracellular Acidosis and Immune Cells. *Mediators Inflamm.* **2018**, 1218297 (2018).
4. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
5. Britland, S. *et al.* The lactate conundrum in wound healing: clinical and experimental findings indicate the requirement for a rapid point-of-care diagnostic. *Biotechnol. Prog.* **28**, 917–924 (2012).
6. Casey, J. R., Grinstein, S. & Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 50–61 (2010).
7. Gottfried, E. *et al.* Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* **107**, 2013–2021 (2006).
8. Fischer, K. *et al.* Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**, 3812–3819 (2007).
9. Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat. Immunol.* **17**, 9–17 (2016).
10. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
11. Xue, J. *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **40**, 274–288 (2014).

12. Shaw, T. N. *et al.* Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *J. Exp. Med.* **215**, 1507–1518 (2018).
13. Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 399–416 (2017).
14. Romero-Garcia, S., Moreno-Altamirano, M. M. B., Prado-Garcia, H. & Sánchez-García, F. J. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol* **7**, 52 (2016).
15. Pucino, V., Bombardieri, M., Pitzalis, C. & Mauro, C. Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.* **47**, 14–21 (2017).
16. Springer, M. Z. & Macleod, K. F. In Brief: Mitophagy: mechanisms and role in human disease. *J. Pathol.* **240**, 253–255 (2016).
17. Gottlieb, R. A. & Bernstein, D. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell Calcium* **60**, 88–101 (2016).
18. Twig, G. & Shirihai, O. S. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1939–1951 (2011).
19. Xiao, B., Deng, X., Zhou, W. & Tan, E.-K. Flow Cytometry-Based Assessment of Mitophagy Using MitoTracker. *Front Cell Neurosci* **10**, 76 (2016).
20. Lee, M. H. *et al.* Mitochondria-immobilized pH-sensitive off-on fluorescent probe. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 14136–14142 (2014).
21. Tal, M. C. *et al.* Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 2770–2775 (2009).
22. Yu, T., Wang, L. & Yoon, Y. Morphological control of mitochondrial bioenergetics. *Front Biosci (Landmark Ed)* **20**, 229–246 (2015).

23. Xie, Z., Nair, U. & Klionsky, D. J. Dissecting autophagosome formation: the missing pieces. *Autophagy* **4**, 920–922 (2008).
24. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313–326 (2010).
25. Dikic, I. & Elazar, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 349–364 (2018).
26. Zhang, Y., Morgan, M. J., Chen, K., Choksi, S. & Liu, Z. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood* **119**, 2895–2905 (2012).
27. Pellegrini, P. *et al.* Tumor acidosis enhances cytotoxic effects and autophagy inhibition by salinomycin on cancer cell lines and cancer stem cells. *Oncotarget* **7**, 35703–35723 (2016).
28. Allen, G. F. G., Toth, R., James, J. & Ganley, I. G. Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep.* **14**, 1127–1135 (2013).
29. Benischke, A.-S. *et al.* Activation of mitophagy leads to decline in Mfn2 and loss of mitochondrial mass in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Sci Rep* **7**, 6656 (2017).
30. Palikaras, K., Lionaki, E. & Tavernarakis, N. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death Differ.* **22**, 1399–1401 (2015).
31. Kaur, J. & Debnath, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 461–472 (2015).
32. Chen, J. L.-Y. *et al.* Lactic acidosis triggers starvation response with paradoxical induction of TXNIP through MondoA. *PLoS Genet.* **6**, e1001093 (2010).
33. Garcia, D. & Shaw, R. J. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol. Cell* **66**, 789–800 (2017).
34. Marino, M. L. *et al.* Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress. *J. Biol. Chem.* **287**, 30664–30676 (2012).

35. Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F. & Kroemer, G. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.* **21**, 805–821 (2015).
36. Mariño, G. *et al.* Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol. Cell* **53**, 710–725 (2014).
37. Hecht, V. C. *et al.* Biophysical changes reduce energetic demand in growth factor-deprived lymphocytes. *J. Cell Biol.* **212**, 439–447 (2016).
38. Chang, T.-K. *et al.* Uba1 functions in Atg7- and Atg3-independent autophagy. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1067–1078 (2013).
39. Newell, K. J. & Tannock, I. F. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors: effects of carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone. *Cancer Res.* **49**, 4477–4482 (1989).
40. Chen, J. L.-Y. *et al.* The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS Genet.* **4**, e1000293 (2008).
41. Xie, J. *et al.* Beyond Warburg effect--dual metabolic nature of cancer cells. *Sci Rep* **4**, 4927 (2014).
42. Persi, E. *et al.* Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. *Nat Commun* **9**, 2997 (2018).
43. Talley, K. & Alexov, E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins* **78**, 2699–2706 (2010).
44. Puchalska, P. & Crawford, P. A. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab.* **25**, 262–284 (2017).
45. Puchalska, P. *et al.* Hepatocyte-Macrophage Acetoacetate Shuttle Protects against Tissue Fibrosis. *Cell Metab.* **29**, 383–398.e7 (2019).

46. Mehta, M. M., Weinberg, S. E. & Chandel, N. S. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 608–620 (2017).
47. Senft, D. & Ronai, Z. A. Adaptive Stress Responses During Tumor Metastasis and Dormancy. *Trends Cancer* **2**, 429–442 (2016).
48. Berezhnov, A. V. *et al.* Intracellular pH Modulates Autophagy and Mitophagy. *J. Biol. Chem.* **291**, 8701–8708 (2016).
49. Rotin, D., Robinson, B. & Tannock, I. F. Influence of hypoxia and an acidic environment on the metabolism and viability of cultured cells: potential implications for cell death in tumors. *Cancer Res.* **46**, 2821–2826 (1986).
50. Wahl, M. L., Pooler, P. M., Briand, P., Leeper, D. B. & Owen, C. S. Intracellular pH regulation in a nonmalignant and a derived malignant human breast cell line. *J. Cell. Physiol.* **183**, 373–380 (2000).
51. Evans, K. *et al.* Acidosis-sensing glutamine pump SNAT2 determines amino acid levels and mammalian target of rapamycin signalling to protein synthesis in L6 muscle cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 1426–1436 (2007).
52. Evans, K. *et al.* Inhibition of SNAT2 by metabolic acidosis enhances proteolysis in skeletal muscle. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 2119–2129 (2008).
53. Tan, H. W. S., Sim, A. Y. L. & Long, Y. C. Glutamine metabolism regulates autophagy-dependent mTORC1 reactivation during amino acid starvation. *Nat Commun* **8**, 338 (2017).
54. Lorin, S. *et al.* Glutamate dehydrogenase contributes to leucine sensing in the regulation of autophagy. *Autophagy* **9**, 850–860 (2013).
55. Meijer, A. J., Lorin, S., Blommaart, E. F. & Codogno, P. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids* **47**, 2037–2063 (2015).

56. Liesa, M. & Shirihai, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* **17**, 491–506 (2013).
57. Arulkumaran, N. *et al.* MITOCHONDRIAL FUNCTION IN SEPSIS. *Shock* **45**, 271–281 (2016).
58. Singer, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* **5**, 66–72 (2014).
59. Brealey, D. & Singer, M. Mitochondrial Dysfunction in Sepsis. *Curr Infect Dis Rep* **5**, 365–371 (2003).
60. Van Wyngene, L., Vandewalle, J. & Libert, C. Reprogramming of basic metabolic pathways in microbial sepsis: therapeutic targets at last? *EMBO Mol Med* **10**, (2018).
61. Wang, A. *et al.* Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation. *Cell* **166**, 1512–1525.e12 (2016).
62. Leite, H. P. & de Lima, L. F. P. Metabolic resuscitation in sepsis: a necessary step beyond the hemodynamic? *J Thorac Dis* **8**, E552–557 (2016).
63. Ohtoshi, M. *et al.* Ketogenesis during sepsis in relation to hepatic energy metabolism. *Res Exp Med (Berl)* **184**, 209–219 (1984).
64. Desquirit-Dumas, V. *et al.* Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 36662–36675 (2013).
65. Iannetti, E. F., Smeitink, J. A. M., Beyrath, J., Willems, P. H. G. M. & Koopman, W. J. H. Multiplexed high-content analysis of mitochondrial morphofunction using live-cell microscopy. *Nat Protoc* **11**, 1693–1710 (2016).

Acknowledgments

The authors sincerely thank Catherine Guillet and Jérôme Cayon (qPCR and cytometry facility; University of Angers) for expert technical assistance, and the staff of the Angers Blood Collection Center for blood collection. This work was supported by institutional grants from the University of Angers and Inserm, and by grants from the regional council of Pays de la Loire (Canceropole Grand-Ouest; project CONCERTO and PlasTICO). Léa Paolini is supported by a grant from the Conseil Général du Maine et Loire and Clément Adam received a grant from the French Ministry of Higher Education and Research. This work was performed in the context of (i) the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment for the future program ANR-11-LABX-0016-01 and (ii) the SIRIC ILIAD program supported by the French National Cancer Institute national (INCa), the Ministry of Health and the Institute for Health and Medical Research (Inserm) (contract INCa-DGOS-Inserm_12558).

Author contributions

C.A., L.Pa., L.Pr., S.B. and P.P. performed most of the experiments and participated in analyses. M.L.M. provided support for the Seahorse experiments. G.M. and F.M. performed and analysed electron microscopy data. N.G. and V.P. provided conceptual guidance for the mitochondrial activity studies. C.A., L.Pa., N.I., A.M, Y.D., C.B. and P.J. designed the study, supervised the experiments, discussed the results and wrote the paper. All of the authors have read, edited, and approved the paper.

Competing interest

The authors have no competing interests to declare.

Correspondence

Pascale Jeannin, Institut de Biologie en Santé, CHU Angers, 4 rue Larrey, F-49933 Angers

pascale.jeannin@univ-angers.fr; +33 (0) 244 688 300

Vincent Procaccio, Institut de Biologie en Santé, CHU Angers, 4 rue Larrey, F-49933 Angers

vincent.procaccio@univ-angers.fr; +33 (0) 241 357 854

6. Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons mis en évidence de nouvelles propriétés de l'acétoacétate sur les macrophages humains d'un point de vue phénotypique et métabolique. Nous montrons que la différenciation des macrophages humains en présence d'acétoacétate conduit à l'acquisition de marqueurs associés aux processus de réparation et de cicatrisation. De plus, dans un contexte d'acidose lactique, rencontrée dans des zones de réparation tissulaire ou d'inflammation chronique, l'acétoacétate protège les macrophages humains des dysfonctions mitochondriales et d'un état de pseudo-privation nutritionnelle.

a. Rôle de l'acétoacétate sur les fonctions effectrices des macrophages, impact du régime cétogène sur la cicatrisation

Nous avons observé que l'exposition de monocytes humains à une concentration d'acétoacétate équivalente au taux des corps cétoniques circulants retrouvés sous régime cétogène, modifiait le profil des macrophages après différenciation. Plus précisément les macrophages présentent en présence d'acétoacétate un profil réparateur et cicatrisant. De plus, un régime cétogène ou la simple application d'acétoacétate apportent un bénéfice sur la réparation tissulaire et la cicatrisation. Ces données identifient les corps cétoniques, et plus particulièrement l'acétoacétate, comme des médiateurs impliqués localement dans la réparation tissulaire et la cicatrisation.

i. L'acétoacétate modifie le phénotype immunitaire des macrophages

La différenciation des monocytes en macrophages est principalement conditionnée par les signaux immunologiques reçus localement, et en particulier les facteurs impliqués dans leur survie (M-CSF et GM-CSF), qui orientent les macrophages vers un profil inflammatoire ou immunorégulateur/réparateur. Cependant, il est dorénavant connu que de nombreux types de signaux peuvent participer également à ce processus de différenciation, et donc d'affiner le profil des macrophages. La diversité des signaux potentiels (nature, concentration/amplitude) conduit à une multitude de profils de macrophages différents. L'acétoacétate est libéré dans la circulation générale par le foie et est capté par les tissus extra-hépatiques comme substrat énergétique. Les corps cétoniques possèdent également des propriétés de signalisation, en particulier le β -hydroxybutyrate, deuxième corps cétonique produit avec l'acétoacétate.

Nous avons observé que les macrophages générés en présence d'acétoacétate expriment fortement des médiateurs impliqués dans la réparation tissulaire et la cicatrisation. Ce processus peut être schématiquement décomposé en 4 étapes successives et interconnectées : l'hémostase,

l'inflammation, la prolifération des kératinocytes et le remodelage tissulaire (Ding and Tredget, 2015). L'expression de différents marqueurs intervenant dans chacune des étapes est potentialisée après différenciation en présence d'acétoacétate : l'hémostase (F3, PLAUT, CXCL1 et PLAT), l'inflammation (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-1 α , CCL2, CCL3L1/L3 et CCL20), la prolifération (HB-EGF, OSM, TNC, IL-36 γ , CXCL2, CXCL5, CXCR4, CCL18 et CCL22) et le remodelage tissulaire (VEGF-A, G-CSF, ANGPT4, MMP1, MMP7 et MMP9). Ainsi, par son impact sur les macrophages, l'acétoacétate pourrait contribuer à la réparation et la cicatrisation.

ii. Le profil phénotypique induit par l'acétoacétate est différent de celui des macrophages réparateurs prototypes.

Parmi la multitude des signaux impliqués dans la polarisation des macrophages, l'IL-4 a été décrite comme un médiateur permettant la génération de macrophages réparateurs (Mosser and Edwards, 2008). Nos données montrent que le profil des macrophages générés en présence d'acétoacétate est différent de celui des macrophages réparateurs prototypes (générés en présence d'IL-4). En effet, en présence d'acétoacétate, les macrophages n'expriment pas les marqueurs induits par l'IL-4, que ce soit les marqueurs membranaires comme dectin-1 ou CD206 mais également les transcrits TGM2 et KIAA1671. Pour autant, les macrophages générés en présence d'IL-4 sécrètent des molécules impliquées dans la réparation, tels que G-CSF, VEGF-A et OSM. Néanmoins, les taux sécrétés sont nettement inférieurs aux macrophages générés en présence d'acétoacétate. De plus, les macrophages générés en présence d'IL-4 ne sécrètent pas tous les facteurs impliqués dans la cicatrisation. A titre d'exemple, HB-EGF qui est crucial dans la réparation tissulaire (Shirakata et al., 2005), est indétectable dans les IL-4-M ϕ . L'ensemble de ces données corrobore le fait que l'implication de l'IL-4 dans le processus de réparation reste controversée. En effet, des souris n'exprimant pas l'IL-4 présentent un processus de cicatrisation normal (Gundra et al., 2014) et des données mettent en évidence une répression génique des marqueurs de cicatrisation, tels que le transcrit de la fibronectine par les kératinocytes en présence d'IL-4 (Serezani et al., 2017). Il apparaît donc que l'acquisition d'un profil réparateur par les macrophages ne soit pas, uniquement, restreinte à la présence d'IL-4 et que d'autres signaux peuvent induire cette signature.

iii. Effet universel de l'acétoacétate sur les macrophages

Dans notre étude, les premières observations de l'effet de l'acétoacétate sur les macrophages humains ont été faites en présence de M-CSF, facteur de différenciation d'expression ubiquitaire et constitutive, indispensable au maintien de l'homéostasie des macrophages dans les tissus (Jeannin et al., 2018). Or, le M-CSF est connu comme induisant la différenciation des monocytes en macrophages

de type M2 (immunorégulateurs et réparateurs), notamment dans un contexte de tumorigénèse (Duluc et al., 2007; Lucas et al., 2010). Nous rapportons ici que la capacité de l'acétoacétate à favoriser l'acquisition d'un profil réparateur n'est pas limitée aux macrophages générés en présence de M-CSF. En effet, des macrophages humains de type M1 (générés en présence de GM-CSF ou de GM-CSF et d'IFN- γ) ou les macrophages réparateurs prototypes exposés à l'acétoacétate, présentent une sécrétion augmentée des marqueurs de la cicatrisation, tels que G-CSF, OSM et HB-EGF. L'effet de l'acétoacétate sur les macrophages est également observé sur des macrophages d'origine murine, faisant de l'acétoacétate une molécule « universelle » favorisant l'émergence de macrophages aux propriétés réparatrices.

Le bénéfice d'un régime cétogène est évalué dans de nombreuses pathologies, notamment dans le cancer, du fait que les cellules cancéreuses agressives sont caractérisées par un métabolisme altéré du glucose. Ainsi, le régime cétogène se positionne comme une stratégie pour limiter la prolifération tumorale. Des études rapportent des résultats prometteurs, notamment dans le glioblastome (Weber et al., 2018). Les cellules immunitaires, et en particulier les macrophages qui représentent l'infiltrat immunitaire majoritaire dans les tumeurs solides, ont un rôle majeur dans la tumorigénèse, notamment par leur profil réparateur associé à la synthèse de facteurs de croissance (EGF, HB-EGF) (Mantovani et al., 2017). Nous rapportons que ces macrophages, présents localement dans le microenvironnement tumoral, réagissent également à la présence d'acétoacétate et expriment une même signature (potentialisation de l'expression des marqueurs de cicatrisation). Cette étude n'est pas en contradiction avec l'utilisation d'un régime cétogène en cas de cancer mais souligne l'importance d'évaluer les conséquences de ce régime sur le stroma tumoral.

iv. Effets de l'acétoacétate sur la respiration oxydative cellulaire

Il a été décrit que les macrophages M2 ont un métabolisme majoritairement oxydatif (Pearce and Pearce, 2013). De plus, les macrophages générés en présence d'IL-4 présentent une augmentation de la respiration oxydative (Diskin and Palsson-McDermott, 2018). Nous rapportons que l'acétoacétate augmente également la respiration cellulaire des macrophages humains, avec une augmentation des taux d'oxygène consommés à l'état basal et dédiés à la synthèse d'ATP, démontrant que les macrophages réparateurs (générés en présence d'IL-4 ou en présence d'acétoacétate) ont recours à la respiration oxydative. L'inhibition de la chaîne respiratoire dans des macrophages générés en présence d'IL-4 modifie leur phénotype, avec une diminution de l'expression des gènes codant pour des marqueurs M2, tels que Arg1 et Mrc1 et du marqueur de surface CD206 (Koo and Garg, 2019). Il est important de noter que nos expériences mettent

uniquement en évidence l'effet de l'acétoacétate sur la respiration oxydative des macrophages humains mais ne permettent pas de relier le métabolisme au phénotype observé.

v. L'effet de l'acétoacétate n'est pas mimé par le β -hydroxybutyrate

L'acétoacétate, qui est consommé par les macrophages, peut être catabolisé par les mitochondries en acétyl-CoA, disponible pour le cycle de Krebs pour une oxydation terminale (Puchalska and Crawford, 2017). Pour cela, les cellules utilisent la voie de la cétolyse via les enzymes BDH1, SCOT et thiolases codées, respectivement, par les gènes BDH1, OXCT1 et ACAT1/ACAT2. Nos résultats montrent que les macrophages expriment ces enzymes de la cétolyse. De plus, nous avons observé que les taux d'acétyl-CoA intracellulaire sont réduits en présence d'acétoacétate ; ce résultat peut être interprété comme la conséquence de son utilisation, notamment par le cycle de Krebs. Néanmoins, nos données montrent que l'expression de l'enzyme BDH1, responsable de l'oxydation du β -hydroxybutyrate en acétoacétate avant son oxydation en acétoacétyl-CoA par SCOT, est très faible. Ces résultats sont corrélés au fait que nous n'avons pas observé d'acquisition des marqueurs de la cicatrisation, tels que G-CSF et VEGF-A par les macrophages générés en présence de β -hydroxybutyrate. Ces données, qui suggèrent que les macrophages humains ne peuvent oxyder le β -hydroxybutyrate, sont confortées par une étude récente qui a montré que les macrophages murins n'expriment pas l'enzyme BDH1 (Puchalska et al., 2019).

vi. Impact du régime cétogène et de l'acétoacétate sur la cicatrisation

Les macrophages ont un rôle crucial dans la réparation tissulaire et la cicatrisation (Minutti et al., 2017). Il a été montré, dans des modèles murins, que les macrophages sont impliqués dans toutes les phases de la cicatrisation et que leur déplétion induit des défaillances dans la réparation tissulaire et la cicatrisation (Lucas et al., 2010). Au vu des effets de l'acétoacétate sur le phénotype des macrophages humains et murins générés in vitro, nous avons évalué la pertinence in vivo de ces observations dans un modèle murin de cicatrisation d'une plaie cutanée. Les résultats obtenus ont permis de montrer, par deux approches différentes, que les corps cétoniques accélèrent la vitesse de cicatrisation d'une plaie. La première approche a été de placer l'animal sous un régime cétogène avant de réaliser la blessure. Ce protocole avait comme objectif de conditionner l'animal en augmentant les taux circulants des corps cétoniques. Les résultats ont montré qu'un animal sous régime cétogène présente une vitesse de cicatrisation plus rapide qu'un animal sous régime classique. La deuxième approche a été d'analyser plus spécifiquement l'impact de l'acétoacétate sur le processus de cicatrisation sur des animaux recevant une nourriture classique (sans

conditionnement). Après avoir créé une plaie cutanée, un groupe de souris a reçu une application quotidienne d'acétoacétate et un deuxième groupe a reçu une application de PBS. Les résultats montrent une vitesse plus rapide de cicatrisation après application d'acétoacétate. Néanmoins, ces deux expériences ne permettent pas de préciser si le bénéfice apporté par le régime cétogène ou l'acétoacétate est lié à une reprogrammation phénotypique des macrophages présents dans le tissu lésé/réparé. Elles permettent uniquement de mettre en évidence le bénéfice du régime cétogène et plus particulièrement de l'acétoacétate sur la vitesse de cicatrisation. De façon intéressante, une thèse publiée en 2016 (Kesi et al., 2016) a également rapporté que les corps cétoniques favorisent la réparation dans un modèle murin de réparation tissulaire/cicatrisation de plaies ischémiques. Dans cette thèse, il est montré que l'apport de β -hydroxybutyrate par voie orale, augmente la vitesse de fermeture de ce type de plaies. Cependant aucune information sur les mécanismes d'action du β -hydroxybutyrate n'est communiquée (effet direct du β -hydroxybutyrate ou dépendance de son oxydation en acétoacétate).

vii. Conclusion

En conclusion, cette première étude a permis d'identifier l'acétoacétate comme un médiateur capable d'induire la différenciation des monocytes humains en macrophages ayant un phénotype réparateur prononcé. Nos données montrent également que l'acétoacétate favorise la respiration oxydative des macrophages humains, confirmant ainsi les données de la littérature sur le métabolisme des macrophages réparateurs.

Ces observations soulignent l'intérêt thérapeutique d'utiliser le régime cétogène et/ou l'acétoacétate pour améliorer le processus de réparation/cicatrisation

viii. Perspectives

Plusieurs perspectives sont envisagées dans le cadre de ce projet. A partir des observations faites sur le phénotype et le métabolisme des macrophages générés en présence d'acétoacétate, étudier leur interconnexion semble intéressante. Dans un premier temps, nous envisageons d'exposer les macrophages à un inhibiteur de la chaîne respiratoire, tel que l'oligomycine, la roténone ou l'antimycine A (inhibant, respectivement, l'ATP synthase, le complexe I et le complexe III), en présence d'acétoacétate et d'analyser le métabolisme et le phénotype. Les inhibiteurs seront testés individuellement selon une approche déjà réalisée sur des macrophages M2 murins (Divakaruni et al., 2018; Van den Bossche et al., 2016). L'analyse du métabolisme se fera par Seahorse® afin de s'assurer de l'inhibition de la chaîne respiratoire dans les macrophages exposés à l'acétoacétate et

aux inhibiteurs. Le phénotype sera analysé en utilisant le panel de marqueurs utilisé dans l'étude. Cette approche permettra de déterminer si l'inhibition du métabolisme a des conséquences directes sur l'acquisition des marqueurs de la cicatrisation induite par l'acétoacétate. Selon les résultats obtenus, il sera intéressant d'étendre cette expérience sur les macrophages M1 générés en présence d'acétoacétate pour mettre en évidence un changement métabolique associé à l'acquisition d'un profil réparateur.

Dans un deuxième temps, et toujours dans l'objectif de lier métabolisme et phénotype, il sera étudié l'impact des métabolites (acétyl-CoA et α -cétoglutarate) pour lesquels un rôle de signalisation et, plus particulièrement, de modulation épigénétique, a été décrit. L'acétyl-CoA et l' α -cétoglutarate sont, respectivement, des donneurs de groupes acétyles et des co-facteurs pour les complexes protéiques ou les enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques, tels que les HAT « histones acétyltransférase », Tet (enzyme déméthylant l'ADN) ou Jmjd3 (histone déméthylase) (Chisolm and Weinmann, 2018). Ce mécanisme a déjà été décrit comme affectant le processus de différenciation des cellules immunitaires comme les macrophages, les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T mémoires (Chisolm and Weinmann, 2018; Liu et al., 2017). Nos données montrent une diminution des taux intracellulaires d'acétyl-CoA par les macrophages générés en présence d'acétoacétate, qui peut être associée à une utilisation par les cellules comme donneur de groupes acétyles pour les HAT. Il serait donc intéressant d'étudier ce processus dans les macrophages générés en présence d'acétoacétate en analysant (i) le niveau d'expression des ARNm codant pour les HAT à des temps précoces et (ii) l'état d'acétylation des histones après différenciation. Si les résultats sont en faveur d'une régulation des HAT en présence d'acétoacétate, une exposition des macrophages, en présence d'acétoacétate, à un inducteur des HDAC devrait créer une compétition avec l'acétoacétate, modulant donc l'état d'acétylation des histones et, donc, l'expression des marqueurs de cicatrisation.

Le métabolite α -cétoglutarate est un intermédiaire du cycle de Krebs qui peut également être produit par la voie de la glutamine. L' α -cétoglutarate est un co-facteur de l'histone déméthylase Jmjd3 et de l'enzyme déméthylant l'ADN, Tet (Chisolm and Weinmann, 2018). Une étude a démontré que la génération des macrophages murins en présence d'IL-4 était dépendante de l'axe α -cétoglutarate-Jmjd3, diminuant les niveaux de méthylation des histones caractérisés comme étant des modifications épigénétiques répressives (Liu et al., 2017). De la même manière que pour l'acétylation des histones, il serait intéressant d'explorer l'axe α -cétoglutarate-Jmjd3 en analysant l'expression des gènes codant pour les histones déméthylases et les enzymes déméthylases de l'ADN à des temps précoces, et d'évaluer en parallèle la méthylation des histones (associée à une répression ou une

activation de la transcription génique) par Western Blot, et de l'ADN par pyroséquencage. Enfin, si cet axe est impliqué dans l'acquisition d'un profil réparateur par des macrophages générés en présence d'acétoacétate, l' α -cétoglutarate devrait mimer le profil réparateur obtenu avec l'acétoacétate. Le 2-hydroxyglutarate est un métabolite produit à partir de l' α -cétoglutarate sous l'action des enzymes « Isocitrate Dehydrogenase » IDH1 et IDH2 ; il représente un inhibiteur compétitif des dioxygénases Jmjd et TET dépendantes de l' α -cétoglutarate (Ye et al., 2018). Il a été décrit que le 2-hydroxyglutarate prévenait l'acquisition de fonctions effectrices des lymphocytes T CD8+ activés et favorisait leur différenciation en cellules mémoires en modulant le niveau de méthylation des histones (Tyrakis et al., 2016). Exposer les macrophages à l'acétoacétate ou à l' α -cétoglutarate en présence de 2-hydroxyglutarate et analyser les marqueurs de la réparation permettrait de préciser si le mécanisme induit par l'acétoacétate est médié par un changement épigénétique dépendant de l' α -cétoglutarate.

Ces expériences permettront de préciser le lien entre métabolisme et phénotype réparateur des macrophages générés en présence d'acétoacétate et de dévoiler le mécanisme par lequel ce profil est obtenu.

Une deuxième perspective serait d'approfondir les expériences in vivo et plus particulièrement d'analyser la composante macrophagique afin de vérifier si l'impact du régime cétogène sur la cicatrisation est bien associé à une reprogrammation phénotypique des macrophages. Un prélèvement du tissu cicatriciel au cours de la cicatrisation et une caractérisation phénotypique permettra de décrire le profil des macrophages présents. Nous analyserons l'expression des marqueurs de cicatrisation par les macrophages isolés du tissu cicatriciel de souris sous régime cétogène ou ayant reçu une application topique d'acétoacétate, comparativement aux souris ayant reçu une nourriture conventionnelle ou une application de diluent.

Enfin, sur la base de l'hypothèse de l'existence d'une cétogenèse extra-hépatique, dans la mesure où différents types cellulaires, et en particulier les fibroblastes, expriment l'enzyme HMGCS2 (Martinez-Outschoorn et al., 2014). HMGCS2 permet de condenser l'acétoacétyl-CoA avec une molécule d'acétyl-CoA pour former l'hydroxyméthylglutaryl (HMG)-CoA, étape importante de cétogenèse et dont l'expression était longtemps restreinte aux hépatocytes (Puchalska and Crawford, 2017). Une cétogenèse locale, lors de la réparation tissulaire et la cicatrisation, permettrait la synthèse de corps cétoniques, dont l'acétoacétate, favorisant ainsi la réparation tissulaire et la cicatrisation en étant captés et métabolisés, notamment par les cellules présentes comme les macrophages. Ainsi, il serait

intéressant d'analyser l'expression des enzymes de la cétogenèse, dont HMGCS2, sur un broyat de peau du tissu lésionnel. Une autre façon de démontrer le rôle des corps cétoniques dans le processus de cicatrisation serait d'utiliser des souris $PPAR\alpha^{-/-}$ qui présentent une déficience de la cétogenèse (Cotter et al., 2014) afin de démontrer que la cicatrisation est ralentie en l'absence de corps cétoniques.

b. Rôle de l'acétoacétate sur le métabolisme des macrophages humains dans un contexte d'acidose lactique

L'acidose lactique est une caractéristique des lésions lésées, telles que le microenvironnement tumoral ou les zones de réparation tissulaire. Dans une première étude, nous avons démontré que l'exposition in vitro de monocytes à une acidose lactique induisait leur différenciation en macrophages présentant un phénotype mixte, combinant des caractéristiques proinflammatoires (M1) et trophiques (M2) (Manuscrit en Annexe 1). L'acquisition de ce phénotype mixte résulte de (i) une métabolisation du lactate exogène, (ii) une consommation autocrine du M-CSF et (iii) une stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α . Néanmoins, et contrairement à d'autres types cellulaires, telles que les cellules tumorales (Senft and Ronai, 2016), l'adaptation métabolique des macrophages à cet environnement difficile est méconnue. Nous avons observé qu'au cours de la différenciation en acidose lactique, les macrophages présentent une reprogrammation métabolique associée à une dysfonction mitochondriale conduisant à une mitophagie. Cette reprogrammation métabolique conduit également les cellules à adopter un état de pseudo-starvation, nécessitant un recours à l'autophagie pour assurer leur survie. De manière surprenante, nous avons observé que l'acétoacétate protège les macrophages contre l'état de pseudo-starvation et la mitophagie, en prévenant notamment la dépolarisation mitochondriale.

i. L'acidose lactique induit un état de pseudo-starvation

Nous avons observé qu'une exposition à un environnement mimant une acidose lactique au cours de la différenciation de monocytes humains en macrophages conduit à un état de pseudo-starvation caractérisé par une capacité réduite à capturer des nutriments (glucose et acides aminés). Cette forte réduction, qui peut également moduler les voies métaboliques comme la glycolyse, peut s'expliquer par une acidification rapide du cytosol (Berezhnov et al., 2016; Marino et al., 2012; Rotin et al., 1986; Wahl et al., 2000). Cette acidification intracellulaire inhibe les enzymes glycolytiques de cellules tumorales (Xie et al., 2014) ainsi que les pompes à glutamine, sensibles à l'acidose (Evans et al., 2007; Evans et al., 2008).

ii. L'autophagie induite par l'acidose lactique permet la survie cellulaire

Des études sur les mécanismes d'adaptation métabolique des cellules tumorales à l'acidose ont permis de souligner le rôle essentiel de l'autophagie pour leur survie (Baldini et al., 2016; Pellegrini et al., 2016). Dans cette étude, nous montrons que les macrophages humains, qui sont des cellules non proliférantes, ont également recours à l'autophagie pour survivre à l'acidose lactique. Cette phase d'autophagie apparaît précocement et est transitoire. Le fait qu'elle soit transitoire peut être corrélé à la consommation d'acides aminés comme la glutamine ; en effet, au cours de la différenciation, la consommation de glutamine et d'acides aminés par les macrophages générés en présence d'acide lactique n'est pas nulle. Il a été démontré que les acides aminés, tels que la leucine et la glutamine inhibent l'autophagie, l'enzyme GLUD1, activée par la leucine et responsable du catabolisme de la glutamine, est un senseur moléculaire des taux d'acides aminés intracellulaires et permet d'inhiber l'autophagie par l'activation de MTORC1 (Lorin et al., 2013; Meijer et al., 2015; Tan et al., 2017).

iii. Les macrophages en acidose lactique présentent des dysfonctions mitochondriales qui sont prévenues par l'acétoacétate

Le terme « dynamique mitochondriale » regroupe l'ensemble des phénomènes impliqués dans la réorganisation permanente du réseau mitochondrial (morphologies, épisodes de fission/fusion). Cette dynamique mitochondriale est particulièrement sensible à la quantité de nutriments disponibles dans l'environnement cellulaire (Liesa and Shirihai, 2013). En cas de privation nutritionnelle la fission des mitochondries est inhibée avec pour conséquence un allongement des mitochondries dû à une fusion sans opposition (Liesa and Shirihai, 2013). Cet allongement des mitochondries permet de limiter leur élimination par mitophagie et d'augmenter la capacité de production d'ATP par molécules de nutriments consommés. Ainsi, il est possible de subvenir à la demande énergétique des cellules malgré une privation nutritionnelle (Liesa and Shirihai, 2013). De façon contradictoire, en cas d'acidose lactique induisant un état de pseudo-starvation, nous avons observé que les macrophages humains présentent une augmentation du nombre de mitochondries dysfonctionnelles et ont un recours à la mitophagie, objectivé par des évènements de fission (réseau mitochondrial fragmenté et diminution de la taille et de la masse mitochondriale). Il a déjà été décrit qu'une chute du pH intracellulaire, induite par un pH extracellulaire acide, déclenche l'autophagie et la mitophagie (Berezhnov et al., 2016; Marino et al., 2012; Rotin et al., 1986; Wahl et al., 2000). Il est important de noter que la chute du pH intracellulaire est courte, avec une normalisation après 24

heures, soulignant que les mécanismes intervenant dans la régulation du pH (Casey et al., 2010) sont efficaces dans les cellules myéloïdes humaines.

De façon intéressante, nous avons observé que les processus d'autophagie, mitophagie et pseudo-starvation induits par l'acidose lactique sont limités en présence d'acétoacétate. Ce résultat est en accord avec le fait que l'acétoacétate représente une alternative métabolique pour les cellules en cas de famine ou de restriction glucidique. Nous pouvons mettre en avant, au moins, deux raisons pour lesquelles l'acétoacétate protège les macrophages en acidose lactique : (i) l'oxydation de l'acétoacétate par les mitochondries ne requiert pas d'ATP, son catabolisme pouvant donc être maintenu même en pseudo-starvation et (ii) l'oxydation mitochondriale de l'acétoacétate conduit à la formation d'acétyl-CoA qui est oxydé par le cycle de Krebs et permet la formation de cofacteurs nécessaires à la chaîne respiratoire, maintenant ainsi le potentiel de membrane des mitochondries. Ainsi, la dépolarisation des membranes mitochondriales et l'état de pseudo-starvation sont évités, ne nécessitant donc plus l'élimination des mitochondries et le recours à l'autophagie. Cet effet de l'acétoacétate n'a pas été observé en présence du β -hydroxybutyrate, et ceci pour la même raison que celle évoquée dans l'étude n°1 (absence ou faible expression d'expression de BDH1).

iv. Conclusion

En conclusion, cette deuxième étude démontre que les macrophages humains ont la capacité de survivre à un environnement acide et précise les mécanismes d'adaptation métaboliques mis en jeu. L'acidose lactique conduit à un état de stress : les macrophages présentent un état de privation nutritionnelle, une augmentation du nombre de mitochondries dysfonctionnelles et une reprogrammation métabolique. Ainsi, afin d'assurer leur survie, les macrophages ont recours à une mitophagie et à une autophagie transitoire. Nous rapportons pour la première fois que cet état de stress peut être limité par l'acétoacétate. Ces travaux identifient l'acétoacétate comme un métabolite naturel et unique pouvant protéger les macrophages des effets médiés par l'acidose lactique, notamment en maintenant l'intégrité et les fonctions mitochondriales.

v. Perspectives

La principale perspective de cette étude est de valider in vivo nos observations

Plusieurs situations cliniques sont associées à une acidose tissulaire (zone de cicatrisation/réparation, microenvironnement des tumeurs solides) ou une acidose systémique (choc septique). Dans le cas du sepsis, des anomalies mitochondriales surviennent précocement (dépolarisation mitochondriales, diminution de la respiration mitochondriale et de la production

d'ATP) et leur persistance conduit à des dysfonctions d'organes et est associé à un mauvais pronostic clinique (Arulkumaran et al., 2016; Brealey and Singer, 2003; Singer, 2014). Bien que les mécanismes mis en jeu restent mal connus, il a été suggéré que les médiateurs inflammatoires seraient impliqués (Van Wyngene et al., 2018). De plus, il a été décrit que le sepsis conduit à une hyperlactémie, conséquence d'une élimination insuffisante par la gluconéogenèse hépatique, et résultant en une acidose lactique ($\text{pH} < 7.35$) (Kimmoun et al., 2015; Van Wyngene et al., 2018). Dans la majorité des cas, une acidose lactique sévère ($\text{pH} < 7.2$) est associée à un taux de mortalité d'environ 50 % et aucun cas de survie n'est constaté en cas de choc septique avec une acidose lactique présentant un pH inférieur à 7 (Kimmoun et al., 2015). D'après nos résultats obtenus sur les macrophages humains exposés à une acidose lactique, nous suggérons que les dysfonctions mitochondriales observées durant le sepsis peuvent être induites par une acidose lactique chronique. Il serait donc intéressant d'analyser des macrophages tissulaires isolés de patient en choc septique et avec une acidose lactique. Ainsi, l'état du réseau mitochondrial, le métabolisme et les marqueurs impliqués dans l'autophagie et la mitophagie pourront être étudiés et faire le corolaire avec les résultats obtenus in vitro.

De plus, il a été observé, dans le sepsis, une diminution du catabolisme du glucose, des acides gras et des acides aminés qui a, comme conséquence, un statut de famine (Van Wyngene et al., 2018). Là encore, nos résultats in vitro ont mis en évidence qu'une acidose lactique conduisait à un état de pseudo-starvation des cellules myéloïdes. Il serait donc intéressant de confirmer cette observation sur des macrophages tissulaires de patients en choc septique.

Enfin, des études ont montré que la cétogenèse est inhibée en cas de sepsis (Ohtoshi et al., 1984; Wannemacher et al., 1979) alors que les corps cétoniques représentent un substrat métabolique en cas de famine. Nos premiers résultats montrent un rôle protecteur de l'acétoacétate contre les dysfonctions mitochondriales en cas d'acidose lactique. Il apparaît donc que l'administration de corps cétoniques pourrait représenter une alternative dans le cas du sepsis. Confirmant cette hypothèse, une étude a mis en évidence que la délétion de NLRP3 augmentait la survie chez la souris en cas de sepsis et protégeait les neutrophiles de l'autophagie (Jin et al., 2017). Or, des effets similaires sont décrits pour le β -hydroxybutyrate qui joue un rôle d'inhibiteur de NLRP3 (Youm et al., 2015) et pour l'acétoacétate qui, dans notre modèle, prévient l'autophagie induite par une acidose lactique. Ainsi, afin de vérifier in vivo l'impact des corps cétoniques sur la survie lors d'un choc septique, nous pouvons utiliser un modèle murin de choc septique (péritonite induite après ligature et perforation cæcale (CLP)). L'évaluation de la survie des animaux nourris préalablement par un régime cétogène

ou non permettra d'évaluer les effets des corps cétoniques. Cette approche pourra être étendue à une deuxième série d'expérience qui consistera en l'injection intraveineuse d'acétoacétate ou de β -hydroxybutyrate après CLP et à l'évaluation de la survie des animaux. Un prélèvement des macrophages tissulaires sur les différents groupes et une analyse du réseau mitochondrial confirmera in vivo les premières observations.

Les résultats de ce second travail permettront de (i) mettre en évidence les effets in vivo d'une acidose lactique sur des macrophages tissulaires de patients en choc septique et de (ii) évaluer l'intérêt thérapeutique des corps cétoniques sur la survie et la protection face aux dysfonctions mitochondriales en cas de choc septique.

7. Références bibliographiques

- Abe, T., Shimamura, M., Jackman, K., Kurinami, H., Anrather, J., Zhou, P., Iadecola, C., 2010. Key role of CD36 in Toll-like receptor 2 signaling in cerebral ischemia. *Stroke*. 41, 898-904.
- Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., Malarkannan, S., 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 9, 1869.
- Ackerman, V., Marini, M., Vittori, E., Bellini, A., Vassali, G., Mattoli, S., 1994. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness. *Chest*. 105, 687-96.
- Allen, B.G., Bhatia, S.K., Anderson, C.M., Eichenberger-Gilmore, J.M., Sibenaller, Z.A., Mapuskar, K.A., Schoenfeld, J.D., Buatti, J.M., Spitz, D.R., Fath, M.A., 2014. Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: History and potential mechanism. *Redox Biol*. 2, 963-70.
- Andreaskos, E., Foxwell, B., Feldmann, M., 2004. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol Rev*. 202, 250-65.
- Angelin, A., Gil-de-Gomez, L., Dahiya, S., Jiao, J., Guo, L., Levine, M.H., Wang, Z., Quinn, W.J., 3rd, Kopinski, P.K., Wang, L., Akimova, T., Liu, Y., Bhatti, T.R., Han, R., Laskin, B.L., Baur, J.A., Blair, I.A., Wallace, D.C., Hancock, W.W., Beier, U.H., 2017. Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab*. 25, 1282-1293 e7.
- Annibaldi, A., Widmann, C., 2010. Glucose metabolism in cancer cells. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 13, 466-70.
- Arulkumaran, N., Deutschman, C.S., Pinsky, M.R., Zuckerbraun, B., Schumacker, P.T., Gomez, H., Gomez, A., Murray, P., Kellum, J.A., 2016. Mitochondrial Function in Sepsis. *Shock*. 45, 271-81.
- Atri, C., Guerfali, F.Z., Laouini, D., 2018. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 19.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 2007. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab*. 5, 426-37.
- Baldini, N., Sonveaux, P., De Mito, A., Supuran, C.T., Otto, A.M., Stock, C.M., Pedersen, S.F., Favicchio, R., Avnet, S., 2016. Metabolism and microenvironment in cancer plasticity. *Cancer & Metabolism*. 4.
- Barger, J.L., Vann, J.M., Cray, N.L., Pugh, T.D., Mastaloudis, A., Hester, S.N., Wood, S.M., Newton, M.A., Weindruch, R., Prolla, T.A., 2017. Identification of tissue-specific transcriptional markers of caloric restriction in the mouse and their use to evaluate caloric restriction mimetics. *Aging Cell*. 16, 750-760.
- Barry, M., Bleackley, R.C., 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol*. 2, 401-9.
- Benmoussa, K., Garaude, J., Acin-Perez, R., 2018. How Mitochondrial Metabolism Contributes to Macrophage Phenotype and Functions. *J Mol Biol*. 430, 3906-3921.
- Bennstein, S.B., 2017. Unraveling Natural Killer T-Cells Development. *Front Immunol*. 8, 1950.
- Berezhnov, A.V., Soutar, M.P., Fedotova, E.I., Frolova, M.S., Plun-Favreau, H., Zinchenko, V.P., Abramov, A.Y., 2016. Intracellular pH Modulates Autophagy and Mitophagy. *J Biol Chem*. 291, 8701-8.
- Berry, M.A., Hargadon, B., Shelley, M., Parker, D., Shaw, D.E., Green, R.H., Bradding, P., Brightling, C.E., Wardlaw, A.J., Pavord, I.D., 2006. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med*. 354, 697-708.

- Blinzinger, K., Kreutzberg, G., 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 85, 145-57.
- Bosurgi, L., Cao, Y.G., Cabeza-Cabrerizo, M., Tucci, A., Hughes, L.D., Kong, Y., Weinstein, J.S., Licona-Limon, P., Schmid, E.T., Pelorosso, F., Gagliani, N., Craft, J.E., Flavell, R.A., Ghosh, S., Rothlin, C.V., 2017. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science.* 356, 1072-1076.
- Bottazzi, B., Doni, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2010. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. *Annu Rev Immunol.* 28, 157-83.
- Bourdonnay, E., Zaslona, Z., Penke, L.R., Speth, J.M., Schneider, D.J., Przybranowski, S., Swanson, J.A., Mancuso, P., Freeman, C.M., Curtis, J.L., Peters-Golden, M., 2015. Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling. *J Exp Med.* 212, 729-42.
- Bowman, R.L., Klemm, F., Akkari, L., Pyonteck, S.M., Sevenich, L., Quail, D.F., Dhara, S., Simpson, K., Gardner, E.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Brennan, C.W., Tabar, V., Gutin, P.H., Joyce, J.A., 2016. Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Rep.* 17, 2445-2459.
- Brana, I., Calles, A., LoRusso, P.M., Yee, L.K., Puchalski, T.A., Seetharam, S., Zhong, B., de Boer, C.J., Tabernero, J., Calvo, E., 2015. Carlumab, an anti-C-C chemokine ligand 2 monoclonal antibody, in combination with four chemotherapy regimens for the treatment of patients with solid tumors: an open-label, multicenter phase 1b study. *Target Oncol.* 10, 111-23.
- Brealey, D., Singer, M., 2003. Mitochondrial Dysfunction in Sepsis. *Curr Infect Dis Rep.* 5, 365-371.
- Breton, G., 2015. [Origin and development of human dendritic cells]. *Med Sci (Paris).* 31, 725-7.
- Brightling, C., Berry, M., Amrani, Y., 2008. Targeting TNF-alpha: a novel therapeutic approach for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 121, 5-10; quiz 11-2.
- Canton, J., Neculai, D., Grinstein, S., 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol.* 13, 621-34.
- Casey, J.R., Grinstein, S., Orlowski, J., 2010. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11, 50-61.
- Catrina, A.I., Trollmo, C., af Klint, E., Engstrom, M., Lampa, J., Hermansson, Y., Klareskog, L., Ulfgren, A.K., 2005. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum.* 52, 61-72.
- Chambers, S.K., 2009. Role of CSF-1 in progression of epithelial ovarian cancer. *Future Oncol.* 5, 1429-40.
- Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K., Itano, N., 2014. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 6, 1670-90.
- Chiffolleau, E., 2018. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets. *Front Immunol.* 9, 227.
- Chisolm, D.A., Weinmann, A.S., 2018. Connections Between Metabolism and Epigenetics in Programming Cellular Differentiation. *Annu Rev Immunol.* 36, 221-246.
- Chriett, S., Dabek, A., Wojtala, M., Vidal, H., Balcerzyk, A., Pirola, L., 2019. Prominent action of butyrate over beta-hydroxybutyrate as histone deacetylase inhibitor, transcriptional modulator and anti-inflammatory molecule. *Sci Rep.* 9, 742.
- Chu, P.G., Arber, D.A., 2001. CD79: a review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 9, 97-106.
- Colegio, O.R., Chu, N.Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., Cline, G.W., Phillips, A.J., Medzhitov, R., 2014. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 513, 559-63.

- Cotter, D.G., Ercal, B., d'Avignon, D.A., Dietzen, D.J., Crawford, P.A., 2014. Impairments of hepatic gluconeogenesis and ketogenesis in PPAR α -deficient neonatal mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 307, E176-85.
- Covarrubias, A.J., Aksoylar, H.I., Yu, J., Snyder, N.W., Worth, A.J., Iyer, S.S., Wang, J., Ben-Sahra, I., Byles, V., Polynne-Stapornkul, T., Espinosa, E.C., Lamming, D., Manning, B.D., Zhang, Y., Blair, I.A., Horng, T., 2016. Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *Elife.* 5.
- Crinier, A., Viant, C., Girard-Madoux, M., Vivier, E., 2017. [Innate lymphoid cells]. *Med Sci (Paris).* 33, 534-542.
- Crispe, I.N., 2011. Liver antigen-presenting cells. *J Hepatol.* 54, 357-65.
- Crotty, S., 2011. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol.* 29, 621-63.
- Dahlin, M., Elfving, A., Ungerstedt, U., Amark, P., 2005. The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. *Epilepsy Res.* 64, 115-25.
- Dai, X.M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., Stanley, E.R., 2002. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood.* 99, 111-20.
- Daikhin, Y., Yudkoff, M., 1998. Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev Neurosci.* 20, 358-64.
- Dashti, H.M., Mathew, T.C., Hussein, T., Asfar, S.K., Behbahani, A., Khoursheed, M.A., Al-Sayer, H.M., Bo-Abbas, Y.Y., Al-Zaid, N.S., 2004. Long-term effects of a ketogenic diet in obese patients. *Exp Clin Cardiol.* 9, 200-5.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., Gan, W.B., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 8, 752-8.
- De Nardo, D., Labzin, L.I., Kono, H., Seki, R., Schmidt, S.V., Beyer, M., Xu, D., Zimmer, S., Lahrmann, C., Schildberg, F.A., Vogelhuber, J., Kraut, M., Ulas, T., Kerksiek, A., Krebs, W., Bode, N., Grebe, A., Fitzgerald, M.L., Hernandez, N.J., Williams, B.R., Knolle, P., Kneilling, M., Rocken, M., Lutjohann, D., Wright, S.D., Schultze, J.L., Latz, E., 2014. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol.* 15, 152-60.
- Dedkova, E.N., Blatter, L.A., 2014. Role of beta-hydroxybutyrate, its polymer poly-beta-hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate in mammalian health and disease. *Front Physiol.* 5, 260.
- Dhillon, K.K., Gupta, S., 2019. Biochemistry, Ketogenesis.
- Ding, J., Tredget, E.E., 2015. The Role of Chemokines in Fibrotic Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 4, 673-686.
- Diskin, C., Palsson-McDermott, E.M., 2018. Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Front Immunol.* 9, 270.
- Divakaruni, A.S., Hsieh, W.Y., Minarrieta, L., Duong, T.N., Kim, K.K.O., Desousa, B.R., Andreyev, A.Y., Bowman, C.E., Caradonna, K., Dranka, B.P., Ferrick, D.A., Liesa, M., Stiles, L., Rogers, G.W., Braas, D., Ciaraldi, T.P., Wolfgang, M.J., Sparwasser, T., Berod, L., Bensinger, S.J., Murphy, A.N., 2018. Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. *Cell Metab.* 28, 490-503 e7.
- Dixon, L.J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M.T., Nagy, L.E., 2013. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol.* 3, 785-97.

- Doni, A., Stravalaci, M., Inforzato, A., Magrini, E., Mantovani, A., Garlanda, C., Bottazzi, B., 2019. The Long Pentraxin PTX3 as a Link Between Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Cancer. *Front Immunol.* 10, 712.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., Tschopp, J., 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 320, 674-7.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K.A., Rock, K.L., Moore, K.J., Wright, S.D., Hornung, V., Latz, E., 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature.* 464, 1357-61.
- Duluc, D., Delneste, Y., Tan, F., Moles, M.P., Grimaud, L., Lenoir, J., Preisser, L., Anegon, I., Catala, L., Ifrah, N., Descamps, P., Gamelin, E., Gascan, H., Hebbar, M., Jeannin, P., 2007. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood.* 110, 4319-30.
- Duluc, D., Corvaisier, M., Blanchard, S., Catala, L., Descamps, P., Gamelin, E., Ponsoda, S., Delneste, Y., Hebbar, M., Jeannin, P., 2009. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int J Cancer.* 125, 367-73.
- Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2004. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 21, 137-48.
- Dwyer, A.R., Greenland, E.L., Pixley, F.J., 2017. Promotion of Tumor Invasion by Tumor-Associated Macrophages: The Role of CSF-1-Activated Phosphatidylinositol 3 Kinase and Src Family Kinase Motility Signaling. *Cancers (Basel).* 9.
- Eloqayli, H., Melo, T.M., Haukvik, A., Sonnewald, U., 2011. [2,4-(13)C]beta-hydroxybutyrate metabolism in astrocytes and C6 glioblastoma cells. *Neurochem Res.* 36, 1566-73.
- Endo, Y., Matsushita, M., Fujita, T., 2011. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol.* 43, 705-12.
- Erra Diaz, F., Dantas, E., Geffner, J., 2018. Unravelling the Interplay between Extracellular Acidosis and Immune Cells. *Mediators Inflamm.* 2018, 1218297.
- Erreni, M., Mantovani, A., Allavena, P., 2011. Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron.* 4, 141-54.
- Evans, K., Nasim, Z., Brown, J., Butler, H., Kauser, S., Varoqui, H., Erickson, J.D., Herbert, T.P., Bevington, A., 2007. Acidosis-sensing glutamine pump SNAT2 determines amino acid levels and mammalian target of rapamycin signalling to protein synthesis in L6 muscle cells. *J Am Soc Nephrol.* 18, 1426-36.
- Evans, K., Nasim, Z., Brown, J., Clapp, E., Amin, A., Yang, B., Herbert, T.P., Bevington, A., 2008. Inhibition of SNAT2 by metabolic acidosis enhances proteolysis in skeletal muscle. *J Am Soc Nephrol.* 19, 2119-29.
- Feldmann, M., Maini, R.N., 2001. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol.* 19, 163-96.
- Feng, X., Teitelbaum, S.L., 2013. Osteoclasts: New Insights. *Bone Res.* 1, 11-26.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., Alnemri, E.S., 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature.* 458, 509-13.
- Fine, E.J., Feinman, R.D., 2004. Thermodynamics of weight loss diets. *Nutr Metab (Lond).* 1, 15.
- Flannagan, R.S., Jaumouille, V., Grinstein, S., 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol.* 7, 61-98.
- Fleetwood, A.J., Lawrence, T., Hamilton, J.A., Cook, A.D., 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display

- differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol.* 178, 5245-52.
- Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Garo, E., Ifrah, N., Guardiola, P., Delneste, Y., Jeannin, P., 2013. IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS One.* 8, e56045.
- Freud, A.G., Mundy-Bosse, B.L., Yu, J., Caligiuri, M.A., 2017. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity.* 47, 820-833.
- Fricker, M., Gibson, P.G., 2017. Macrophage dysfunction in the pathogenesis and treatment of asthma. *Eur Respir J.* 50.
- Galvan-Pena, S., O'Neill, L.A., 2014. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol.* 5, 420.
- Garaude, J., Acin-Perez, R., Martinez-Cano, S., Enamorado, M., Ugolini, M., Nistal-Villan, E., Hervás-Stubbs, S., Pelegrin, P., Sander, L.E., Enriquez, J.A., Sancho, D., 2016. Mitochondrial respiratory-chain adaptations in macrophages contribute to antibacterial host defense. *Nat Immunol.* 17, 1037-1045.
- Geeraerts, X., Bolli, E., Fendt, S.M., Van Ginderachter, J.A., 2017. Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. *Front Immunol.* 8, 289.
- Geering, B., Stoeckle, C., Conus, S., Simon, H.U., 2013. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* 34, 398-409.
- Gentles, A.J., Newman, A.M., Liu, C.L., Bratman, S.V., Feng, W., Kim, D., Nair, V.S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C.D., Diehn, M., West, R.B., Plevritis, S.K., Alizadeh, A.A., 2015. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med.* 21, 938-945.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 330, 841-5.
- Ginhoux, F., Guilliams, M., 2016. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity.* 44, 439-449.
- Godwin, J.W., Pinto, A.R., Rosenthal, N.A., 2013. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 9415-20.
- Gonzalez, L., Trigatti, B.L., 2017. Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Can J Cardiol.* 33, 303-312.
- Gordon, S., 2016. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity.* 44, 463-475.
- Gordon, S., Pluddemann, A., 2017. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol.* 15, 53.
- Gottlieb, R.A., Bernstein, D., 2016. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell Calcium.* 60, 88-101.
- Grabacka, M., Pierzchalska, M., Dean, M., Reiss, K., 2016. Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR α . *Int J Mol Sci.* 17.
- Graff, E.C., Fang, H., Wanders, D., Judd, R.L., 2016. Anti-inflammatory effects of the hydroxycarboxylic acid receptor 2. *Metabolism.* 65, 102-13.
- Gregory, C.D., Devitt, A., 2004. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology.* 113, 1-14.
- Gundra, U.M., Girgis, N.M., Ruckerl, D., Jenkins, S., Ward, L.N., Kurtz, Z.D., Wiens, K.E., Tang, M.S., Basu-Roy, U., Mansukhani, A., Allen, J.E., Loke, P., 2014. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood.* 123, e110-22.

- Hamann, J., Koning, N., Pouwels, W., Ulfman, L.H., van Eijk, M., Stacey, M., Lin, H.H., Gordon, S., Kwakkenbos, M.J., 2007. EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur J Immunol.* 37, 2797-802.
- Hamilton, J.A., 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 8, 533-44.
- Hamilton, J.A., Cook, A.D., Tak, P.P., 2016. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 16, 53-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144, 646-74.
- Harris, I.R., Hoppner, H., Siefken, W., Farrell, A.M., Wittern, K.P., 2000. Regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase by insulin and epidermal growth factor in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 114, 83-7.
- He, W., Newman, J.C., Wang, M.Z., Ho, L., Verdin, E., 2012. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 23, 467-76.
- Hecht, V.C., Sullivan, L.B., Kimmerling, R.J., Kim, D.H., Hosios, A.M., Stockslager, M.A., Stevens, M.M., Kang, J.H., Wirtz, D., Vander Heiden, M.G., Manalis, S.R., 2016. Biophysical changes reduce energetic demand in growth factor-deprived lymphocytes. *J Cell Biol.* 212, 439-47.
- Helft, J., Bottcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B.U., Goubau, D., Reis e Sousa, C., 2015. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity.* 42, 1197-211.
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., Poidinger, M., Zolezzi, F., Larbi, A., Ng, L.G., Chan, J.K., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F., 2015. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity.* 42, 665-78.
- Hoeffel, G., Ginhoux, F., 2018. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol.* 330, 5-15.
- Hofnagel, O., Luechtenborg, B., Weissen-Plenz, G., Robenek, H., 2007. Statins and foam cell formation: impact on LDL oxidation and uptake of oxidized lipoproteins via scavenger receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1771, 1117-24.
- Hong, C., Tontonoz, P., 2008. Coordination of inflammation and metabolism by PPAR and LXR nuclear receptors. *Curr Opin Genet Dev.* 18, 461-7.
- Hou, C., Zhao, H., Liu, L., Li, W., Zhou, X., Lv, Y., Shen, X., Liang, Z., Cai, S., Zou, F., 2011. High mobility group protein B1 (HMGB1) in Asthma: comparison of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy controls. *Mol Med.* 17, 807-15.
- Houri Levi, E., Watad, A., Whitby, A., Tiosano, S., Comaneshter, D., Cohen, A.D., Amital, H., 2016. Coexistence of ischemic heart disease and rheumatoid arthritis patients-A case control study. *Autoimmun Rev.* 15, 393-6.
- Houtkooper, R.H., Williams, R.W., Auwerx, J., 2010. Metabolic networks of longevity. *Cell.* 142, 9-14.
- Hoving, J.C., Wilson, G.J., Brown, G.D., 2014. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol.* 16, 185-94.
- Hugo, S.E., Cruz-Garcia, L., Karanth, S., Anderson, R.M., Stainier, D.Y., Schlegel, A., 2012. A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting. *Genes Dev.* 26, 282-93.
- Izquierdo, E., Cuevas, V.D., Fernandez-Arroyo, S., Riera-Borrull, M., Orta-Zavalza, E., Joven, J., Rial, E., Corbi, A.L., Escribese, M.M., 2015. Reshaping of Human Macrophage Polarization through Modulation of Glucose Catabolic Pathways. *J Immunol.* 195, 2442-51.
- Jacquot, S., Boyer, O., 2006. [Heterogeneity and function of human B lymphocytes]. *Med Sci (Paris).* 22, 1075-80.

- Javaid, N., Choi, S., 2017. Acetylation- and Methylation-Related Epigenetic Proteins in the Context of Their Targets. *Genes (Basel)*. 8.
- Jeannin, P., Paolini, L., Adam, C., Delneste, Y., 2018. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *FEBS J.* 285, 680-699.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., Allen, J.E., 2011. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 332, 1284-8.
- Jha, A.K., Huang, S.C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K.M., Ashall, J., Everts, B., Pearce, E.J., Driggers, E.M., Artyomov, M.N., 2015. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*. 42, 419-30.
- Jin, L., Batra, S., Jeyaseelan, S., 2017. Deletion of Nlrp3 Augments Survival during Polymicrobial Sepsis by Decreasing Autophagy and Enhancing Phagocytosis. *J Immunol*. 198, 1253-1262.
- Jung, J., Zeng, H., Horng, T., 2019. Metabolism as a guiding force for immunity. *Nat Cell Biol*. 21, 85-93.
- Kaplan, M.H., 2013. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev*. 252, 104-15.
- Kaur, J., Debnath, J., 2015. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 16, 461-72.
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 5, 461.
- Kelly, B., O'Neill, L.A., 2015. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res*. 25, 771-84.
- Kesl, S.L., D'Agostion, D.P., Wu, M., 2016. Metabolic therapy for age-dependent impaired wound healing. Vol., ed. ^eds. University of South Florida, Tampa, pp. 1 online resource (244 pages).
- Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 91, 461-553.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A., 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 77, 10-8.
- Kim, C.J., Nazli, A., Rojas, O.L., Chege, D., Alidina, Z., Huibner, S., Mujib, S., Benko, E., Kovacs, C., Shin, L.Y., Grin, A., Kandel, G., Loutfy, M., Ostrowski, M., Gommerman, J.L., Kaushic, C., Kaul, R., 2012. A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis. *Mucosal Immunol*. 5, 670-80.
- Kimmoun, A., Novy, E., Auchet, T., Ducrocq, N., Levy, B., 2015. Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: from bench to bedside. *Crit Care*. 19, 175.
- Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., Kobayashi, M., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., 2011. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 8030-5.
- Kinne, R.W., Brauer, R., Stuhlmuller, B., Palombo-Kinne, E., Burmester, G.R., 2000. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2, 189-202.
- Klement, R.J., 2019. The emerging role of ketogenic diets in cancer treatment. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 22, 129-134.
- Knutson, K.L., Disis, M.L., 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 54, 721-8.
- Koh, Y.W., Park, C., Yoon, D.H., Suh, C., Huh, J., 2014. CSF-1R expression in tumor-associated macrophages is associated with worse prognosis in classical Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 141, 573-83.
- Koo, S.J., Garg, N.J., 2019. Metabolic programming of macrophage functions and pathogens control. *Redox Biol*. 24, 101198.

- Kosinski, C., Jornayvaz, F.R., 2017. Effects of Ketogenic Diets on Cardiovascular Risk Factors: Evidence from Animal and Human Studies. *Nutrients*. 9.
- Krzyszczuk, P., Schloss, R., Palmer, A., Berthiaume, F., 2018. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol*. 9, 419.
- Kumar, B.V., Connors, T.J., Farber, D.L., 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 48, 202-213.
- Lacey, D.C., Achuthan, A., Fleetwood, A.J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G.M., Chang, M.W., Beckman, S.K., Cook, A.D., Hamilton, J.A., 2012. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol*. 188, 5752-65.
- Laffel, L., 1999. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 15, 412-26.
- Lapenna, A., De Palma, M., Lewis, C.E., 2018. Perivascular macrophages in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 18, 689-702.
- Lapierre, P., Alvarez, F., 2007. [The liver: an organ of the immune system?]. *Med Sci (Paris)*. 23, 985-90.
- Lauber, S., Wong, S., Cutz, J.C., Tanaka, M., Barra, N., Lhotak, S., Ashkar, A., Richards, C.D., 2015. Novel function of Oncostatin M as a potent tumour-promoting agent in lung. *Int J Cancer*. 136, 831-43.
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., Merad, M., 2015. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 15, 731-44.
- Lawand, M., Dechanet-Merville, J., Dieu-Nosjean, M.C., 2017. Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. *Front Immunol*. 8, 761.
- Lee, Y.G., Jeong, J.J., Nyenhuis, S., Berdyshev, E., Chung, S., Ranjan, R., Karpurapu, M., Deng, J., Qian, F., Kelly, E.A., Jarjour, N.N., Ackerman, S.J., Natarajan, V., Christman, J.W., Park, G.Y., 2015. Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCl2, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 52, 772-84.
- Liang, Z., Zhang, Q., Thomas, C.M., Chana, K.K., Gibeon, D., Barnes, P.J., Chung, K.F., Bhavsar, P.K., Donnelly, L.E., 2014. Impaired macrophage phagocytosis of bacteria in severe asthma. *Respir Res*. 15, 72.
- Liesa, M., Shirihi, O.S., 2013. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*. 17, 491-506.
- Lim, S., Caramori, G., Tomita, K., Jazrawi, E., Oates, T., Chung, K.F., Barnes, P.J., Adcock, I.M., 2004. Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy*. 59, 505-14.
- Lin, C.F., Lin, C.M., Lee, K.Y., Wu, S.Y., Feng, P.H., Chen, K.Y., Chuang, H.C., Chen, C.L., Wang, Y.C., Tseng, P.C., Tsai, T.T., 2017. Escape from IFN-gamma-dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *J Biomed Sci*. 24, 10.
- Liu, K., Li, F., Sun, Q., Lin, N., Han, H., You, K., Tian, F., Mao, Z., Li, T., Tong, T., Geng, M., Zhao, Y., Gu, W., Zhao, W., 2019. p53 beta-hydroxybutyrylation attenuates p53 activity. *Cell Death Dis*. 10, 243.
- Liu, P.S., Wang, H., Li, X., Chao, T., Teav, T., Christen, S., Di Conza, G., Cheng, W.C., Chou, C.H., Vavakova, M., Muret, C., Debackere, K., Mazzone, M., Huang, H.D., Fendt, S.M., Ivanisevic, J., Ho, P.C., 2017. alpha-ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol*. 18, 985-994.

- Loeb, J.A., Drickamer, K., 1988. Conformational changes in the chicken receptor for endocytosis of glycoproteins. Modulation of ligand-binding activity by Ca²⁺ and pH. *J Biol Chem.* 263, 9752-60.
- Lorin, S., Tol, M.J., Bauvy, C., Strijland, A., Pous, C., Verhoeven, A.J., Codogno, P., Meijer, A.J., 2013. Glutamate dehydrogenase contributes to leucine sensing in the regulation of autophagy. *Autophagy.* 9, 850-60.
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., Roers, A., Eming, S.A., 2010. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol.* 184, 3964-77.
- Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., Xia, B., 2012. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012, 925135.
- Macia, L., Tan, J., Vieira, A.T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., Ian McKenzie, C., Hijikata, A., Wong, C., Binge, L., Thorburn, A.N., Chevalier, N., Ang, C., Marino, E., Robert, R., Offermanns, S., Teixeira, M.M., Moore, R.J., Flavell, R.A., Fagarasan, S., Mackay, C.R., 2015. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun.* 6, 6734.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A., 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549-55.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sozzani, S., Vecchi, A., Locati, M., Sica, A., 2004a. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin Cancer Biol.* 14, 155-60.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004b. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-86.
- Mantovani, A., Allavena, P., 2015. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med.* 212, 435-45.
- Mantovani, A., Marchesi, F., Malesci, A., Laghi, L., Allavena, P., 2017. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 14, 399-416.
- Marino, G., Pietrocola, F., Eisenberg, T., Kong, Y., Malik, S.A., Andryushkova, A., Schroeder, S., Pendl, T., Harger, A., Niso-Santano, M., Zamzami, N., Scoazec, M., Durand, S., Enot, D.P., Fernandez, A.F., Martins, I., Kepp, O., Senovilla, L., Bauvy, C., Morselli, E., Vacchelli, E., Bennetzen, M., Magnes, C., Sinner, F., Pieber, T., Lopez-Otin, C., Maiuri, M.C., Codogno, P., Andersen, J.S., Hill, J.A., Madeo, F., Kroemer, G., 2014. Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol Cell.* 53, 710-25.
- Marino, M.L., Pellegrini, P., Di Lernia, G., Djavaheri-Mergny, M., Brnjic, S., Zhang, X., Hagg, M., Linder, S., Fais, S., Codogno, P., De Milito, A., 2012. Autophagy is a protective mechanism for human melanoma cells under acidic stress. *J Biol Chem.* 287, 30664-76.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2014. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle.* 11, 3964-3971.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A., 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 177, 7303-11.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M., 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13, 453-61.
- Martinez, F.O., Helming, L., Milde, R., Varin, A., Melgert, B.N., Draijer, C., Thomas, B., Fabbri, M., Crawshaw, A., Ho, L.P., Ten Hacken, N.H., Cobos Jimenez, V., Kootstra, N.A., Hamann, J., Greaves, D.R., Locati, M., Mantovani, A., Gordon, S., 2013. Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood.* 121, e57-69.

- Matzinger, P., 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 296, 301-5.
- McInnes, I.B., Schett, G., 2017. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*. 389, 2328-2337.
- McNally, M.A., Hartman, A.L., 2012. Ketone bodies in epilepsy. *J Neurochem*. 121, 28-35.
- Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 1, 135-45.
- Mehta, M.M., Weinberg, S.E., Chandel, N.S., 2017. Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. *Nat Rev Immunol*. 17, 608-620.
- Meijer, A.J., Lorin, S., Blommaart, E.F., Codogno, P., 2015. Regulation of autophagy by amino acids and MTOR-dependent signal transduction. *Amino Acids*. 47, 2037-63.
- Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Turlomousis, P., Dabritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., Corr, S.C., McManus, G., Ryan, D., Jacobs, H.T., Szibor, M., Xavier, R.J., Braun, T., Frezza, C., Murphy, M.P., O'Neill, L.A., 2016. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*. 167, 457-470 e13.
- Minutti, C.M., Knipper, J.A., Allen, J.E., Zaiss, D.M., 2017. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol*. 61, 3-11.
- Moisan, F., Francisco, E.B., Brozovic, A., Duran, G.E., Wang, Y.C., Chaturvedi, S., Seetharam, S., Snyder, L.A., Doshi, P., Sikic, B.I., 2014. Enhancement of paclitaxel and carboplatin therapies by CCL2 blockade in ovarian cancers. *Mol Oncol*. 8, 1231-9.
- Moore, K.J., Sheedy, F.J., Fisher, E.A., 2013. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 13, 709-21.
- Morscher, R.J., Aminzadeh-Gohari, S., Feichtinger, R.G., Mayr, J.A., Lang, R., Neureiter, D., Sperl, W., Kofler, B., 2015. Inhibition of Neuroblastoma Tumor Growth by Ketogenic Diet and/or Calorie Restriction in a CD1-Nu Mouse Model. *PLoS One*. 10, e0129802.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 8, 958-69.
- Munoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martinez-Colon, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., Nunez, G., 2013. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 38, 1142-53.
- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol*. 89, 557-63.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N., Wynn, T.A., 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 41, 14-20.
- Musa-Veloso, K., Likhodii, S.S., Cunnane, S.C., 2002. Breath acetone is a reliable indicator of ketosis in adults consuming ketogenic meals. *Am J Clin Nutr*. 76, 65-70.
- Nadif, R., Zerimech, F., Bouzigon, E., Matran, R., 2013. The role of eosinophils and basophils in allergic diseases considering genetic findings. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 13, 507-13.
- Nakayama, T., Hirahara, K., Onodera, A., Endo, Y., Hosokawa, H., Shinoda, K., Tumes, D.J., Okamoto, Y., 2017. Th2 Cells in Health and Disease. *Annu Rev Immunol*. 35, 53-84.
- Neal, E.G., Chaffe, H., Schwartz, R.H., Lawson, M.S., Edwards, N., Fitzsimmons, G., Whitney, A., Cross, J.H., 2008. The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 7, 500-6.
- Newell, K.J., Tannock, I.F., 1989. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors: effects of carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone. *Cancer Res*. 49, 4477-82.

- Newman, J.C., Verdin, E., 2014a. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab.* 25, 42-52.
- Newman, J.C., Verdin, E., 2014b. beta-hydroxybutyrate: much more than a metabolite. *Diabetes Res Clin Pract.* 106, 173-81.
- Newman, J.C., Covarrubias, A.J., Zhao, M., Yu, X., Gut, P., Ng, C.P., Huang, Y., Haldar, S., Verdin, E., 2017. Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metab.* 26, 547-557 e8.
- Newman, J.C., Verdin, E., 2017. beta-Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annu Rev Nutr.* 37, 51-76.
- Nielsen, J.V., Joensson, E.A., 2008. Low-carbohydrate diet in type 2 diabetes: stable improvement of bodyweight and glycemic control during 44 months follow-up. *Nutr Metab (Lond).* 5, 14.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F., 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 308, 1314-8.
- Noh, H.S., Hah, Y.S., Nilufar, R., Han, J., Bong, J.H., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., 2006. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci Res.* 83, 702-9.
- Nohr, M.K., Egerod, K.L., Christiansen, S.H., Gille, A., Offermanns, S., Schwartz, T.W., Moller, M., 2015. Expression of the short chain fatty acid receptor GPR41/FFAR3 in autonomic and somatic sensory ganglia. *Neuroscience.* 290, 126-37.
- Noviski, M., Mueller, J.L., Satterthwaite, A., Garrett-Sinha, L.A., Brombacher, F., Zikherman, J., 2018. IgM and IgD B cell receptors differentially respond to endogenous antigens and control B cell fate. *Elife.* 7.
- O'Neill, L.A., Kishton, R.J., Rathmell, J., 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol.* 16, 553-65.
- O'Neill, L.A., Pearce, E.J., 2016. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med.* 213, 15-23.
- Obeng, J.A., Amoruso, A., Camaschella, G.L., Sola, D., Brunelleschi, S., Fresu, L.G., 2016. Modulation of human monocyte/macrophage activity by tocilizumab, abatacept and etanercept: An in vitro study. *Eur J Pharmacol.* 780, 33-7.
- Ohtoshi, M., Jikko, A., Asano, M., Uchida, K., Ozawa, K., Tobe, T., 1984. Ketogenesis during sepsis in relation to hepatic energy metabolism. *Res Exp Med (Berl).* 184, 209-19.
- Oishi, Y., Manabe, I., 2018. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol.* 30, 511-528.
- Okabe, Y., Medzhitov, R., 2016. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol.* 17, 9-17.
- Padgett, E.L., Pruett, S.B., 1992. Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 186, 775-81.
- Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N., 2015. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis. *Cell Death Differ.* 22, 1399-401.
- Paoli, A., Rubini, A., Volek, J.S., Grimaldi, K.A., 2013. Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *Eur J Clin Nutr.* 67, 789-96.
- Papayannopoulos, V., 2018. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 18, 134-147.
- Pearce, E.L., Pearce, E.J., 2013. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity.* 38, 633-43.
- Pellegrini, P., Dyczynski, M., Sbrana, F.V., Karlgren, M., Buoncervello, M., Hagg-Olofsson, M., Ma, R., Hartman, J., Bajalica-Lagercrantz, S., Grander, D., Kharaziha, P., De Milito, A., 2016. Tumor acidosis enhances cytotoxic effects and autophagy inhibition by salinomycin on cancer cell lines and cancer stem cells. *Oncotarget.* 7, 35703-35723.

- Peterman, M.G., 1925. The Ketogenic Diet in Epilepsy. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 84, 1979.
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Madeo, F., Kroemer, G., 2015. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab*. 21, 805-21.
- Piran, M., Vakilian, S., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Hosseinzadeh, S., Ardeshtyrlajimi, A., 2018. In vitro fibroblast migration by sustained release of PDGF-BB loaded in chitosan nanoparticles incorporated in electrospun nanofibers for wound dressing applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 46, 511-520.
- Pohin, M., Guesdon, W., Mekouo, A.A., Rabeony, H., Paris, I., Atanassov, H., Favot, L., McHeik, J., Bernard, F.X., Richards, C.D., Amiaud, J., Blanchard, F., Lecron, J.C., Morel, F., Jegou, J.F., 2016. Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation. *Eur J Immunol*. 46, 1737-51.
- Ponzoni, M., Pastorino, F., Di Paolo, D., Perri, P., Brignole, C., 2018. Targeting Macrophages as a Potential Therapeutic Intervention: Impact on Inflammatory Diseases and Cancer. *Int J Mol Sci*. 19.
- Poon, I.K., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Ravichandran, K.S., 2014. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol*. 14, 166-80.
- Porchet, N., Aubert, J.P., 2004. [MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]. *Med Sci (Paris)*. 20, 569-74.
- Preisser, L., Miot, C., Le Guillou-Guillemette, H., Beaumont, E., Foucher, E.D., Garo, E., Blanchard, S., Fremaux, I., Croue, A., Fouchard, I., Lunel-Fabiani, F., Boursier, J., Roingeard, P., Cales, P., Delneste, Y., Jeannin, P., 2014. IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology*. 60, 1879-90.
- Puchalska, P., Crawford, P.A., 2017. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab*. 25, 262-284.
- Puchalska, P., Martin, S.E., Huang, X., Lengfeld, J.E., Daniel, B., Graham, M.J., Han, X., Nagy, L., Patti, G.J., Crawford, P.A., 2019. Hepatocyte-Macrophage Acetoacetate Shuttle Protects against Tissue Fibrosis. *Cell Metab*. 29, 383-398 e7.
- Raes, G., Van den Bergh, R., De Baetselier, P., Ghassabeh, G.H., Scotton, C., Locati, M., Mantovani, A., Sozzani, S., 2005. Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol*. 174, 6561; author reply 6561-2.
- Rahman, M., Muhammad, S., Khan, M.A., Chen, H., Ridder, D.A., Muller-Fielitz, H., Pokorna, B., Vollbrandt, T., Stolting, I., Nadrowitz, R., Okun, J.G., Offermanns, S., Schwaninger, M., 2014. The beta-hydroxybutyrate receptor HCA2 activates a neuroprotective subset of macrophages. *Nat Commun*. 5, 3944.
- Rajasekaran, N., Chester, C., Yonezawa, A., Zhao, X., Kohrt, H.E., 2015. Enhancement of antibody-dependent cell mediated cytotoxicity: a new era in cancer treatment. *Immunotargets Ther*. 4, 91-100.
- Ramanathan, S., Jagannathan, N., 2014. Tumor associated macrophage: a review on the phenotypes, traits and functions. *Iran J Cancer Prev*. 7, 1-8.
- Reikine, S., Nguyen, J.B., Modis, Y., 2014. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front Immunol*. 5, 342.
- Riabov, V., Gudima, A., Wang, N., Mickley, A., Orekhov, A., Kzhyshkowska, J., 2014. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol*. 5, 75.
- Ries, C.H., Cannarile, M.A., Hoves, S., Benz, J., Wartha, K., Runza, V., Rey-Giraud, F., Pradel, L.P., Feuerhake, F., Klamann, I., Jones, T., Jucknischke, U., Scheiblich, S., Kaluza, K., Gorr, I.H.,

- Walz, A., Abiraj, K., Cassier, P.A., Sica, A., Gomez-Roca, C., de Visser, K.E., Italiano, A., Le Tourneau, C., Delord, J.P., Levitsky, H., Blay, J.Y., Ruttinger, D., 2014. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell*. 25, 846-59.
- Roberts, M.N., Wallace, M.A., Tomilov, A.A., Zhou, Z., Marcotte, G.R., Tran, D., Perez, G., Gutierrez-Casado, E., Koike, S., Knotts, T.A., Imai, D.M., Griffey, S.M., Kim, K., Hagopian, K., McMackin, M.Z., Haj, F.G., Baar, K., Cortopassi, G.A., Ramsey, J.J., Lopez-Dominguez, J.A., 2017. A Ketogenic Diet Extends Longevity and Healthspan in Adult Mice. *Cell Metab*. 26, 539-546 e5.
- Roh, J.S., Sohn, D.H., 2018. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*. 18, e27.
- Rojas-Morales, P., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J., 2016. beta-Hydroxybutyrate: A signaling metabolite in starvation response? *Cell Signal*. 28, 917-23.
- Romero-Garcia, S., Lopez-Gonzalez, J.S., Baez-Viveros, J.L., Aguilar-Cazares, D., Prado-Garcia, H., 2011. Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol Ther*. 12, 939-48.
- Rosales, C., Uribe-Querol, E., 2017. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int*. 2017, 9042851.
- Rosales, C., 2018. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*. 9, 113.
- Rothenberg, M.E., Hogan, S.P., 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 24, 147-74.
- Rotin, D., Robinson, B., Tannock, I.F., 1986. Influence of hypoxia and an acidic environment on the metabolism and viability of cultured cells: potential implications for cell death in tumors. *Cancer Res*. 46, 2821-6.
- Ruan, H.B., Crawford, P.A., 2018. Ketone bodies as epigenetic modifiers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 21, 260-266.
- Saklatvala, J., 1986. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature*. 322, 547-9.
- Sandquist, I., Kolls, J., 2018. Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Res*. 7, 205.
- Santos, J.L., Andrade, A.A., Dias, A.A., Bonjardim, C.A., Reis, L.F., Teixeira, S.M., Horta, M.F., 2006. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. *J Interferon Cytokine Res*. 26, 682-8.
- Saraiva, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 10, 170-81.
- Schneemann, M., Schoedon, G., Hofer, S., Blau, N., Guerrero, L., Schaffner, A., 1993. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis*. 167, 1358-63.
- Schupp, M., Chen, F., Briggs, E.R., Rao, S., Pelzmann, H.J., Pessentheiner, A.R., Bogner-Strauss, J.G., Lazar, M.A., Baldwin, D., Prokesch, A., 2013. Metabolite and transcriptome analysis during fasting suggest a role for the p53-Ddit4 axis in major metabolic tissues. *BMC Genomics*. 14, 758.
- Schwer, B., Eckersdorff, M., Li, Y., Silva, J.C., Fermin, D., Kurtev, M.V., Giallourakis, C., Comb, M.J., Alt, F.W., Lombard, D.B., 2009. Calorie restriction alters mitochondrial protein acetylation. *Aging Cell*. 8, 604-6.
- Scott, C.L., Williams, M., 2018. The role of Kupffer cells in hepatic iron and lipid metabolism. *J Hepatol*. 69, 1197-1199.

- Segaliny, A.I., Brion, R., Mortier, E., Maillason, M., Cherel, M., Jacques, Y., Le Goff, B., Heymann, D., 2015. Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim Biophys Acta*. 1853, 1010-21.
- Senft, D., Ronai, Z.A., 2016. Adaptive Stress Responses During Tumor Metastasis and Dormancy. *Trends Cancer*. 2, 429-442.
- Serezani, A.P.M., Bozdogan, G., Sehra, S., Walsh, D., Krishnamurthy, P., Sierra Potchanant, E.A., Nalepa, G., Goenka, S., Turner, M.J., Spandau, D.F., Kaplan, M.H., 2017. IL-4 impairs wound healing potential in the skin by repressing fibronectin expression. *J Allergy Clin Immunol*. 139, 142-151 e5.
- Shai, I., Schwarzfuchs, D., Henkin, Y., Shahar, D.R., Witkow, S., Greenberg, I., Golan, R., Fraser, D., Bolotin, A., Vardi, H., Tangi-Rozental, O., Zuk-Ramot, R., Sarusi, B., Brickner, D., Schwartz, Z., Sheiner, E., Marko, R., Katorza, E., Thiery, J., Fiedler, G.M., Bluher, M., Stumvoll, M., Stampfer, M.J., 2008. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*. 359, 229-41.
- Sharman, M.J., Kraemer, W.J., Love, D.M., Avery, N.G., Gomez, A.L., Scheett, T.P., Volek, J.S., 2002. A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men. *J Nutr*. 132, 1879-85.
- Shearer, J.D., Richards, J.R., Mills, C.D., Caldwell, M.D., 1997. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. *Am J Physiol*. 272, E181-90.
- Shimazu, T., Hirschey, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C.A., Lim, H., Saunders, L.R., Stevens, R.D., Newgard, C.B., Farese, R.V., Jr., de Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K., Verdin, E., 2013. Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*. 339, 211-4.
- Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Sayama, K., Mekada, E., Higashiyama, S., Hashimoto, K., 2005. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J Cell Sci*. 118, 2363-70.
- Silvestre, J.S., Vandecasteele, G., 2018. [Heart rate: when macrophages hit the note]. *Med Sci (Paris)*. 34, 820-823.
- Simpson, J.L., Daly, J., Baines, K.J., Yang, I.A., Upham, J.W., Reynolds, P.N., Hodge, S., James, A.L., Hugenholtz, P., Willner, D., Gibson, P.G., 2016. Airway dysbiosis: *Haemophilus influenzae* and *Tropheryma* in poorly controlled asthma. *Eur Respir J*. 47, 792-800.
- Singer, M., 2014. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*. 5, 66-72.
- Singh, B.N., Zhang, G., Hwa, Y.L., Li, J., Dowdy, S.C., Jiang, S.W., 2010. Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev Anticancer Ther*. 10, 935-54.
- Siouti, E., Andreacos, E., 2019. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. *Biochem Pharmacol*. 165, 152-169.
- Siracusa, M.C., Kim, B.S., Spergel, J.M., Artis, D., 2013. Basophils and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 132, 789-801; quiz 788.
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E., 2013. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. 13, 145-9.
- Springer, M.Z., Macleod, K.F., 2016. In Brief: Mitophagy: mechanisms and role in human disease. *J Pathol*. 240, 253-255.
- Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D.T., Moore, K.J., 2010.

- CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.* 11, 155-61.
- Stoermer, K.A., Morrison, T.E., 2011. Complement and viral pathogenesis. *Virology.* 411, 362-73.
- Sun, S., Li, H., Chen, J., Qian, Q., 2017. Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology (Bethesda).* 32, 453-463.
- Tabas, I., 2005. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25, 2255-64.
- Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., Lira, S.A., Habenicht, A.J., Randolph, G.J., 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 117, 185-94.
- Taggart, A.K., Kero, J., Gan, X., Cai, T.Q., Cheng, K., Ippolito, M., Ren, N., Kaplan, R., Wu, K., Wu, T.J., Jin, L., Liaw, C., Chen, R., Richman, J., Connolly, D., Offermanns, S., Wright, S.D., Waters, M.G., 2005. (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem.* 280, 26649-52.
- Takayanagi, H., Iizuka, H., Juji, T., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Miyazaki, T., Koshihara, Y., Oda, H., Nakamura, K., Tanaka, S., 2000. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 259-69.
- Tam, L.S., Kitas, G.D., Gonzalez-Gay, M.A., 2014. Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis? *Rheumatology (Oxford).* 53, 1108-19.
- Tan, H.W.S., Sim, A.Y.L., Long, Y.C., 2017. Glutamine metabolism regulates autophagy-dependent mTORC1 reactivation during amino acid starvation. *Nat Commun.* 8, 338.
- Tan, H.Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., Feng, Y., 2016. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016, 2795090.
- Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S.S., Corr, S.C., Haneklaus, M., Caffrey, B.E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F.C., Cummins, E., Nizet, V., Whyte, M., Taylor, C.T., Lin, H., Masters, S.L., Gottlieb, E., Kelly, V.P., Clish, C., Auron, P.E., Xavier, R.J., O'Neill, L.A., 2013. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature.* 496, 238-42.
- Taylor, P.C., Peters, A.M., Paleolog, E., Chapman, P.T., Elliott, M.J., McCloskey, R., Feldmann, M., Maini, R.N., 2000. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43, 38-47.
- Thiruvoth, F., Mohapatra, D., Sivakumar, D., Chittoria, R., Nandhagopal, V., 2015. Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plastic and Aesthetic Research.* 2, 250.
- Tieu, D.D., Peters, A.T., Carter, R.G., Suh, L., Conley, D.B., Chandra, R., Norton, J., Grammer, L.C., Harris, K.E., Kato, A., Kern, R.C., Schleimer, R.P., 2010. Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 667-75.
- Trapp, B.D., Wujek, J.R., Criste, G.A., Jalabi, W., Yin, X., Kidd, G.J., Stohlman, S., Ransohoff, R., 2007. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. *Glia.* 55, 360-8.
- Travis, M.A., Sheppard, D., 2014. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol.* 32, 51-82.

- Twig, G., Shirihai, O.S., 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid Redox Signal.* 14, 1939-51.
- Tyrakis, P.A., Palazon, A., Macias, D., Lee, K.L., Phan, A.T., Velica, P., You, J., Chia, G.S., Sim, J., Doedens, A., Abelanet, A., Evans, C.E., Griffiths, J.R., Poellinger, L., Goldrath, A.W., Johnson, R.S., 2016. S-2-hydroxyglutarate regulates CD8(+) T-lymphocyte fate. *Nature.* 540, 236-241.
- Udalova, I.A., Mantovani, A., Feldmann, M., 2016. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 12, 472-85.
- Ursini, F., Leporini, C., Bene, F., D'Angelo, S., Mauro, D., Russo, E., De Sarro, G., Olivieri, I., Pitzalis, C., Lewis, M., Grembiale, R.D., 2017. Anti-TNF-alpha agents and endothelial function in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 7, 5346.
- Van Acker, H.H., Anguille, S., Willemen, Y., Smits, E.L., Van Tendeloo, V.F., 2016. Bisphosphonates for cancer treatment: Mechanisms of action and lessons from clinical trials. *Pharmacol Ther.* 158, 24-40.
- Van den Bossche, J., Baardman, J., Otto, N.A., van der Velden, S., Neele, A.E., van den Berg, S.M., Luque-Martin, R., Chen, H.J., Boshuizen, M.C., Ahmed, M., Hoeksema, M.A., de Vos, A.F., de Winther, M.P., 2016. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep.* 17, 684-696.
- van der Windt, G.J., Pearce, E.L., 2012. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev.* 249, 27-42.
- Van Wyngene, L., Vandewalle, J., Libert, C., 2018. Reprogramming of basic metabolic pathways in microbial sepsis: therapeutic targets at last? *EMBO Mol Med.* 10.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 324, 1029-33.
- Vandivier, R.W., Ogden, C.A., Fadok, V.A., Hoffmann, P.R., Brown, K.K., Botto, M., Walport, M.J., Fisher, J.H., Henson, P.M., Greene, K.E., 2002. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol.* 169, 3978-86.
- Vatansever, F., de Melo, W.C., Avci, P., Vecchio, D., Sadasivam, M., Gupta, A., Chandran, R., Karimi, M., Parizotto, N.A., Yin, R., Tegos, G.P., Hamblin, M.R., 2013. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 37, 955-89.
- Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J.I., Zhang, L., Smith, K.L., Morel, C.R., Wagner, R.A., Greaves, D.R., Murray, P.J., Chawla, A., 2006. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab.* 4, 13-24.
- Verdone, L., Caserta, M., Di Mauro, E., 2005. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol.* 83, 344-53.
- Vermijlen, D., Gatti, D., Kouzeli, A., Rus, T., Eberl, M., 2018. gammadelta T cell responses: How many ligands will it take till we know? *Semin Cell Dev Biol.* 84, 75-86.
- Vijayan, V., Pradhan, P., Braud, L., Fuchs, H.R., Gueler, F., Motterlini, R., Foresti, R., Immenschuh, S., 2019. Human and murine macrophages exhibit differential metabolic responses to lipopolysaccharide - A divergent role for glycolysis. *Redox Biol.* 22, 101147.
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Spits, H., 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell.* 174, 1054-1066.
- Vlaicu, P., Mertins, P., Mayr, T., Widschwendter, P., Ataseven, B., Hogel, B., Eiermann, W., Knyazev, P., Ullrich, A., 2013. Monocytes/macrophages support mammary tumor invasivity by co-secreting lineage-specific EGFR ligands and a STAT3 activator. *BMC Cancer.* 13, 197.

- Volek, J.S., Sharman, M.J., Forsythe, C.E., 2005. Modification of lipoproteins by very low-carbohydrate diets. *J Nutr.* 135, 1339-42.
- Wahl, M.L., Pooler, P.M., Briand, P., Leeper, D.B., Owen, C.S., 2000. Intracellular pH regulation in a nonmalignant and a derived malignant human breast cell line. *J Cell Physiol.* 183, 373-80.
- Walens, A., DiMarco, A.V., Lupo, R., Kroger, B.R., Damrauer, J.S., Alvarez, J.V., 2019. CCL5 promotes breast cancer recurrence through macrophage recruitment in residual tumors. *Elife.* 8.
- Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol.* 13, 753-60.
- Wang, Y., Subramanian, M., Yurdagul, A., Jr., Barbosa-Lorenzi, V.C., Cai, B., de Juan-Sanz, J., Ryan, T.A., Nomura, M., Maxfield, F.R., Tabas, I., 2017. Mitochondrial Fission Promotes the Continued Clearance of Apoptotic Cells by Macrophages. *Cell.* 171, 331-345 e22.
- Wannemacher, R.W., Jr., Pace, J.G., Beall, R.A., Dinterman, R.E., Petrella, V.J., Neufeld, H.A., 1979. Role of the liver in regulation of ketone body production during sepsis. *J Clin Invest.* 64, 1565-72.
- Weber, D.D., Aminazdeh-Gohari, S., Kofler, B., 2018. Ketogenic diet in cancer therapy. *Aging (Albany NY).* 10, 164-165.
- Weijenberg, A., van Rijn, M., Callenbach, P.M.C., de Koning, T.J., Brouwer, O.F., 2018. Ketogenic Diet in Refractory Childhood Epilepsy: Starting With a Liquid Formulation in an Outpatient Setting. *Child Neurol Open.* 5, 2329048X18779497.
- Westerterp-Plantenga, M.S., Nieuwenhuizen, A., Tome, D., Soenen, S., Westerterp, K.R., 2009. Dietary protein, weight loss, and weight maintenance. *Annu Rev Nutr.* 29, 21-41.
- Willekens, F.L., Werre, J.M., Kruijt, J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Dopp, Y.A., van den Bos, A.G., Bosman, G.J., van Berkel, T.J., 2005. Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood.* 105, 2141-5.
- Winesett, S.P., Bessone, S.K., Kossoff, E.H., 2015. The ketogenic diet in pharmaco-resistant childhood epilepsy. *Expert Rev Neurother.* 15, 621-8.
- Won, Y.J., Lu, V.B., Puhl, H.L., 3rd, Ikeda, S.R., 2013. beta-Hydroxybutyrate modulates N-type calcium channels in rat sympathetic neurons by acting as an agonist for the G-protein-coupled receptor FFA3. *J Neurosci.* 33, 19314-25.
- Wynn, T.A., Chawla, A., Pollard, J.W., 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 496, 445-55.
- Wynn, T.A., Vannella, K.M., 2016. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 44, 450-62.
- Xie, J., Wu, H., Dai, C., Pan, Q., Ding, Z., Hu, D., Ji, B., Luo, Y., Hu, X., 2014. Beyond Warburg effect--dual metabolic nature of cancer cells. *Sci Rep.* 4, 4927.
- Xie, Z., Zhang, D., Chung, D., Tang, Z., Huang, H., Dai, L., Qi, S., Li, J., Colak, G., Chen, Y., Xia, C., Peng, C., Ruan, H., Kirkey, M., Wang, D., Jensen, L.M., Kwon, O.K., Lee, S., Pletcher, S.D., Tan, M., Lombard, D.B., White, K.P., Zhao, H., Roeder, R.G., Yang, X., Zhao, Y., 2016. Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine beta-Hydroxybutyrylation. *Mol Cell.* 62, 194-206.
- Xue, J., Schmidt, S.V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T.D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M.R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T.C., Ulas, T., Schultze, J.L., 2014. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity.* 40, 274-88.
- Yancy, W.S., Jr., Foy, M., Chalecki, A.M., Vernon, M.C., Westman, E.C., 2005. A low-carbohydrate, ketogenic diet to treat type 2 diabetes. *Nutr Metab (Lond).* 2, 34.

- Yang, L., Wu, Q., Xu, L., Zhang, W., Zhu, Y., Liu, H., Xu, J., Gu, J., 2015. Increased expression of colony stimulating factor-1 is a predictor of poor prognosis in patients with clear-cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 15, 67.
- Ye, D., Guan, K.L., Xiong, Y., 2018. Metabolism, Activity, and Targeting of D- and L-2-Hydroxyglutarates. *Trends Cancer*. 4, 151-165.
- You, Y., Zhang, J., Gong, J., Chen, Y., Li, Y., Yang, K., Liu, Z., 2015. Mesenchymal stromal cell-dependent reprogramming of Kupffer cells is mediated by TNF-alpha and PGE2 and is crucial for liver transplant tolerance. *Immunol Res*. 62, 292-305.
- Youm, Y.H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., Bodogai, M., Kim, D., D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T.D., Kang, S., Horvath, T.L., Fahmy, T.M., Crawford, P.A., Biragyn, A., Alnemri, E., Dixit, V.D., 2015. The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med*. 21, 263-9.
- Yu, L., Wang, L., Chen, S., 2010. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med*. 14, 2592-603.
- Yu, X.H., Fu, Y.C., Zhang, D.W., Yin, K., Tang, C.K., 2013. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 424, 245-52.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Grunstein, R., 1997. Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J Neurochem*. 69, 682-92.
- Zeisbrich, M., Yanes, R.E., Zhang, H., Watanabe, R., Li, Y., Brosig, L., Hong, J., Wallis, B.B., Giacomini, J.C., Assimes, T.L., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2018. Hypermetabolic macrophages in rheumatoid arthritis and coronary artery disease due to glycogen synthase kinase 3b inactivation. *Ann Rheum Dis*. 77, 1053-1062.
- Zeng, S.G., Ghnewa, Y.G., O'Reilly, V.P., Lyons, V.G., Atzberger, A., Hogan, A.E., Exley, M.A., Doherty, D.G., 2013. Human invariant NKT cell subsets differentially promote differentiation, antibody production, and T cell stimulation by B cells in vitro. *J Immunol*. 191, 1666-76.
- Zhang, Q.W., Liu, L., Gong, C.Y., Shi, H.S., Zeng, Y.H., Wang, X.Z., Zhao, Y.W., Wei, Y.Q., 2012. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One*. 7, e50946.
- Zhang, S., Weinberg, S., DeBerge, M., Gainullina, A., Schipma, M., Kinchen, J.M., Ben-Sahra, I., Gius, D.R., Yvan-Charvet, L., Chandel, N.S., Schumacker, P.T., Thorp, E.B., 2019. Efferocytosis Fuels Requirements of Fatty Acid Oxidation and the Electron Transport Chain to Polarize Macrophages for Tissue Repair. *Cell Metab*. 29, 443-456 e5.
- Zhu, J., Yamane, H., Paul, W.E., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*. 28, 445-89.

8. Annexes

- a. Annexe 1: Lactic acidosis cooperates with GM-CSF and M-CSF to induce human macrophages with an inflammatory and pro-tumor phenotype, Paolini L, Adam C et al (article soumis à la revue Cancer Immunology Research)

Cet article présente les résultats de l'étude sur l'impact phénotypique et métabolique d'une acidose lactique sur les macrophages humains. L'acidose lactique caractérise les zones inflammées et lésées et qui sont rencontrées dans de nombreux processus comme la réparation tissulaire et la cicatrisation, l'ischémie ou encore la tumorigénèse. Des études antérieures avaient mis en évidence des effets de l'acidose lactique sur la biologie des cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral comme l'émergence de lymphocytes T régulateurs contribuant à l'immunosuppression ou encore l'acquisition de marqueurs M2 sur des macrophages murins (Angelin et al., 2017; Colegio et al., 2014). Cependant, l'effet de l'acide lactique sur les macrophages humains restait mal connu. Cet article rapporte, pour la première fois, que l'acide lactique est un facteur métabolique impactant le phénotype des macrophages humains. Les macrophages exposés au cours de leur différenciation à de l'acide lactique à des concentrations qui peuvent être rencontrées dans le microenvironnement tumoral présentent un phénotype mixte, combinant un profil inflammatoire et un profil réparateur qui, dans le cancer, favorise la croissance, l'invasion et les métastases. Ce profil est similaire à celui des TAM décrit dans la littérature. Cet effet nécessite une internalisation de l'acide lactique et sa métabolisation mais également une consommation de M-CSF et une stabilisation du facteur de transcription HIF-1. En accord avec ces données in vitro, nous avons mis en évidence, au sein des tumeurs ovariennes, la présence de TAM au sein de tumeur ovariennes, présentant un profil cytokinique mixte (inflammatoire et trophique).

Lactic acidosis cooperates with GM-CSF and M-CSF to induce human macrophages with an inflammatory and pro-tumor phenotype

Running title: Lactic acid induces inflammatory and pro-tumor macrophages

Léa Paolini^{1,#}, Clément Adam^{1,#}, Céline Beauvillain^{1,2}, Laurence Preisser¹, Simon Blanchard^{1,2}, Valérie Seegers^{1,3}, Louise-Marie Chevalier^{1,3}, Pascale Pignon¹, Mario Campone^{1,3}, Pedro Raro³, Romuald Wernert³, Véronique Verrielle³, Norbert Ifrah^{1,4}, Vincent Lavoué^{5,6}, Philippe Descamps⁷, Alain Morel^{1,3}, Véronique Catros⁸, Guillaume Tcherkez⁹, Guy Lenaers¹⁰, Judith Kouassi Nzoughet¹⁰, Vincent Procaccio^{10,11}, Yves Delneste^{1,2,||}, Pascale Jeannin^{1,2,||,*}

¹ CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

² Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, CHU d'Angers, Angers, France

³ Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers, France

⁴ Service des Maladies du Sang, CHU d'Angers, Angers, France

⁵ Service de Gynécologie-obstétrique, CHU de Rennes, Rennes, France

⁶ UMR INSERM 1242, Université de Rennes, Rennes, France

⁷ Département de Gynécologie, CHU d'Angers, Angers, France

⁸ CHU de Rennes, Rennes, France; UMR INSERM 991, Rennes, France; CRB Santé de Rennes, Rennes, France

⁹ Research School of Biology, ANU Joint College of Sciences, Australian National University, Canberra, ACT, Australia

¹⁰ Institut MitoVasc, Université d'Angers, UMR CNRS 6015 INSERM 1083, Angers, France

¹¹ Département de Biochimie et Génétique, CHU d'Angers, Angers, France

Equivalent contribution

|| Equivalent supervision

* Corresponding author: Pascale Jeannin

CRCINA – Unité INSERM 1232, CHU d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers

pascale.jeannin@univ-angers.fr

Tel: +33 (0) 244 688 311; fax: +33 (0) 244 688 594

Keywords: Macrophages, lactic acid, GM-CSF, M-CSF, inflammation, cancer

Financial support

This work was supported by institutional grants from the University of Angers and Inserm and by grants from the Ligue contre le Cancer (comité du Maine et Loire, Angers, France) and the regional council of Pays de la Loire (Canceropole Grand-Ouest; projects PlasTICO and Concerto). Léa Paolini is supported by a grant from Angers Loire Métropole and Clément Adam is a recipient of a grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

Conflict of interest

The authors declare no potential conflicts of interest

Word count: 5263

Number of figures: 7

Abbreviations

EGFR, epidermal growth factor receptor; EMT, epithelial-mesenchymal transition; EREG, epiregulin; ET-1, endothelin 1; FOLR2, folate receptor beta; HB-EGF, heparin-binding epidermal growth factor-like; HGF, hepatocyte growth factor; LA, lactic acid; LDH, lactate dehydrogenase; Mφ, macrophages; MCT, Monocarboxylate Transporter; Mo-DC, monocyte-derived dendritic cells; OSM, oncostatin M; PDGF-BB, platelet-derived growth factor B; SEPP1, selenoprotein P; SERPINB2, serpin family b member 2; TAM, tumor-associated macrophages; TGFα, transforming growth factor α; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A.

Abstract

In established tumors, tumor-associated macrophages (TAM) orchestrate non-resolving cancer-related inflammation and produce mediators that favor tumor growth, metastasis and angiogenesis. To date, factors that confer inflammatory and pro-tumor properties to human macrophages remain largely unknown. Elevated levels of lactic acid (LA) being common in most solid tumors, we analyzed the impact of LA on human monocyte differentiation. We report that prolonged lactic acidosis induces the differentiation of monocytes into macrophages harboring a unique phenotype with pro-tumor and inflammatory characteristics. They produce numerous tumor growth factors, inflammatory cytokines and chemokines and low levels of IL-10. These effects of LA require lactate metabolization and are associated with HIF-1 α stabilization. Surprisingly the expression of some LA-induced genes is dependent on autocrine M-CSF consumption. Finally, TAM with pro-tumor and inflammatory characteristics (VEGF^{high} CXCL8⁺ IL-1 β ⁺) are found in solid ovarian tumors. These results identify tumor-derived LA as a missing link reconciling the pro-tumor features of TAM with their inflammatory properties and reinforce the potential of therapies that reduce tumor glycolysis or tumor-associated acidosis.

Introduction

Macrophages are involved in many physiological processes, such as maintenance of tissue homeostasis, antimicrobial defense and control of immune responses (1). They detect a wide variety of signals (e.g. microbes and cytokines) and sense changes in nutrients and oxygen availability. Consequently, macrophages continuously adapt their phenotypes and functions to tissue requirements (1-3). They are thus characterized by considerable diversity that makes their classification difficult (4). The initial classification into M1 and M2 cells, which represent extremes of a continuum of phenotypes, remains widely used (4,5). M1 are inflammatory and tumoricidal cells that produce inflammatory and Th1-promoting cytokines and low levels of IL-10. Contrastingly, M2 and M2-like cells exhibited immunoregulatory and trophic cells maintaining tissue homeostasis and orchestrating wound healing (2). They produce high levels of IL-10 and mediators involved in the recruitment of regulatory, Th2 and naive T cells, whereas producing low levels of Th1-promoting and inflammatory cytokines (6). Nevertheless, single cell analysis allowed identifying human macrophages exhibiting M1 and M2 features (7,8), particularly in established tumors (9-13). Currently, most known macrophage polarization factors tend to antagonize their own effects rather than to act in an additive or synergistic manner. Thus, polarization factors capable of generating human macrophages with mixed M1/M2 profiles remain to be identified.

Importantly, it should be noted that the biology of human and mouse macrophages differs considerably in terms of differentiation and polarization factors and of specific M1 and M2 markers (14-16). These differences prevent the results obtained with mouse macrophages from being extrapolated to human cells.

In most advanced solid tumors, tumor-associated macrophages (TAM) represent the most abundant population of infiltrating leukocytes (17) and a high degree of TAM infiltration correlates with poor prognosis in various malignancies (2,6). TAM impact virtually all aspects of tumor biology, as they promote angiogenesis, tumor progression, invasion and metastasis. Illustrating their functional diversity, they contribute to the different phases of tumor development. In the early stage of tumor development, macrophages exhibit an anti-tumor M1 phenotype, due to the production of GM-CSF and IFN γ by activated leucocytes (6). Subsequent tumor growth generates signals perceived by monocytes/macrophages as a need for tissue repair, explaining that TAM resemble M2 macrophages. Non-resolving chronic inflammation is a hallmark of carcinogenesis that actively contributes to the exhaustion and inefficiency of T cells. It is now admitted that TAM orchestrate tumor-associated inflammation (6,18,19), suggesting that they might display not only M2-like but also M1 features. So

far, the signals present in the tumor environment and involved in the acquisition of a mixed M1/M2 profile by TAM remain not completely defined.

Most cancer cells sustain a high proliferation rate via aerobic glycolysis (Warburg effect) (20) and divert glucose-derived pyruvate away from the mitochondria toward lactate production. Whereas lactate concentrations in normal tissues at rest are within 1.8-2 mM, they range from 6 to 15 mM in solid tumors, even reaching 40 mM at the highest (21). Once exported through lactate-proton symporters, lactic acid (LA) readily dissociates into lactate and proton (H^+), the latter being responsible for the low extracellular pH in tumor tissues. Lactic acidosis is common in most solid tumors and high levels of lactate are associated with aggressiveness and resistance to treatment (22). Lactate is no longer described solely as a by-product of glycolysis but also as a fueling and signaling molecule, rescuing cancer cells from glucose deprivation (23). Recent studies have shown that LA may act as an immunoregulatory mediator. LA dampens cytotoxic T cell and NK cell functions, favors Treg cell survival (24-27) and triggers the expression of M2 genes in murine macrophages (28-30).

To date, the impact of a chronic exposure to LA on the differentiation of human monocytes remains to be determined. Since TAM derive mainly from monocytes and lactic acidosis is a feature of tumors (22,31), it is likely that the differentiation of monocytes into TAM may take place under lactic acidosis. We report that LA drives the differentiation of human monocytes into macrophages exhibiting a unique inflammatory and trophic phenotype similar to TAM in ovarian tumor.

Materials and Methods

Protocols are detailed in Supplementary Material and Methods.

Monocyte isolation and cell generation

CD14⁺ monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers by positive magnetic cell-sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes (1×10^6 cells/mL) were cultured for 5 days in complete medium (CM), in the presence of 50 ng/mL M-CSF (ORF Genetics, Kopavogur, Iceland) to generate M-M ϕ , or 50 ng/mL GM-CSF (R&D Systems, Lille, France) to generate GM-M ϕ . Prototypic M2 cells and monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) were generated as described (32).

Lactic acidosis, acidosis and lactosis

Monocytes (1×10^6 cells/mL) were differentiated under lactic acidosis by culture for 5 days in CM with 50 ng/mL GM-CSF and 10 mM LA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) (pH=6.5), without or with 3 μ M GW2580, 125 μ M α -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC), 1 μ M acriflavine, 5 mM oxamic acid (all from Sigma-Aldrich), 15 μ M GSK2837808A (Tocris, Lille, France), 1.25 μ M AZD3965 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) or 4 μ g/mL neutralizing anti-M-CSF or control mAbs (R&D Systems). Inhibitors were used at the highest non-toxic concentration (Supplementary Table 1). Monocytes were differentiated under lactosis or acidosis by culture in GM-CSF-containing CM with 10 mM sodium lactate (pH=7.3) (Sigma-Aldrich) or adjusted to pH=6.5 (12.35 mM HCl), respectively.

Cytokine quantification

Macrophages (0.5×10^6 cells/mL), collected after 5-7 days culture, were stimulated or not for 24 h with 200 ng/mL LPS (*E. coli* serotype O111:B4; Sigma-Aldrich) in fresh CM. Cytokines were quantified by multiplex immunoassay (R&D System), except IL-12p70 (Diaclone, Dijon, France), endothelin-1, soluble CD115 (sCD115) and IL-20 (R&D Systems) which were quantified using conventional ELISA; IL-20 was quantified in 5-fold concentrated supernatants. LA did not interfere with cytokine quantification.

Flow cytometry analysis

The expression of CD1a, CD14, CD163, CD115, TNF α , IL-6, IL-1, CXCL8, VEGF and pERK1/2 by macrophages generated in vitro or present in ovarian tumors, stimulated or not with LPS, was analyzed by flow cytometry (Abs are listed in Supplementary Table 2). Data were acquired using a

FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed with the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Results are expressed as relative fluorescence intensity (RFI) or as a percentage of labeled cells.

Analysis of mRNA expression

Total RNA was extracted and reverse transcribed as described (33) and the expression of the mRNA encoding the indicated proteins was evaluated by qPCR. Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using RPS18, EF1A, TBP, RPL13A and PPIA as references (34). The calculation method is based on the conversion of the linear Cq values into a logarithmic scale using the efficiency of PCR as an exponential function; the geometric mean of selected housekeeping genes is used as a normalization factor, allowing eliminating of inter-sample variations.

Lactate and glucose quantification

Glucose and lactate were quantified in cell culture supernatants using enzymatic assays (Abcam, Cambridge, UK). Results are expressed in mmol/L or in mmol/L/24 h (with positive and negative values corresponding to consumption and production, respectively).

Lactic acid metabolization and measurement of oxygen consumption rate

Monocytes were differentiated for 5 days in CM with GM-CSF plus 10 mM ^{13}C -lactate sodium (Sigma-Aldrich) (pH=6.5). ^{13}C -containing metabolites present in culture supernatants and cell extracts were analyzed by NMR spectroscopy and LC-MS, respectively. The XF96 extracellular flux analyzer (Seahorse analyzer; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was used to determine the bioenergetic profiles of macrophages.

Co-culture assay

Monocytes were cultured with the primary tumor cells CASC170, CKC0829 and CKT0151 cells selected on their capacity to produce LA (Supplementary Fig. S1a) using Transwell units (Corning, New York, NY); monocytes (1×10^6 cells/mL) were seeded in the lower compartment (containing GM-CSF, without or with of CHC) and 2.5×10^4 tumor cells were added in the upper compartment. In some experiments, macrophages (0.5×10^6 cells/mL in fresh CM) were stimulated with 200 ng/mL LPS for 24 h.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). The non-parametric Wilcoxon matched-pairs test was used to compare means. For the comparison of antigen

expression time course, two-way analysis of variance (ANOVA) with a posthoc Bonferroni's multiple comparison test was used. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Results

Lactic acidosis gives rise to human CD14^{high} CD163^{high} macrophages

GM-CSF is overexpressed in tumor sites and allows human monocytes to survive and differentiate into macrophages (15). To assess the impact of lactic acidosis on monocyte differentiation, human monocytes were cultured with GM-CSF, without or with LA, and their phenotype was analyzed at day 5. In agreement with a previous study (35), LA was used at 10 mM, the highest non-toxic concentration for human monocytes/macrophages (Fig. 1a) that corresponds to the ones found in tumor sites (27).

Upon lactic acidosis (10 mM LA, pH=6.5), monocytes differentiated into macrophages (GM+LA-Mφ), as evidenced by the expression of the macrophage markers CD14 and CD163 but not of the Mo-DC marker CD1a (Fig. 1b&c). The expression of CD14 and CD163 was higher on GM+LA-Mφ than on GM-Mφ, both at the protein (Fig. 1c) and mRNA levels (Fig. 1d). The expression of CD163 was time-dependently upregulated during the differentiation process (Fig. 1e). As previously reported (32), M-Mφ also exhibited a CD14^{high} CD163^{high} phenotype (Fig. 1b-e).

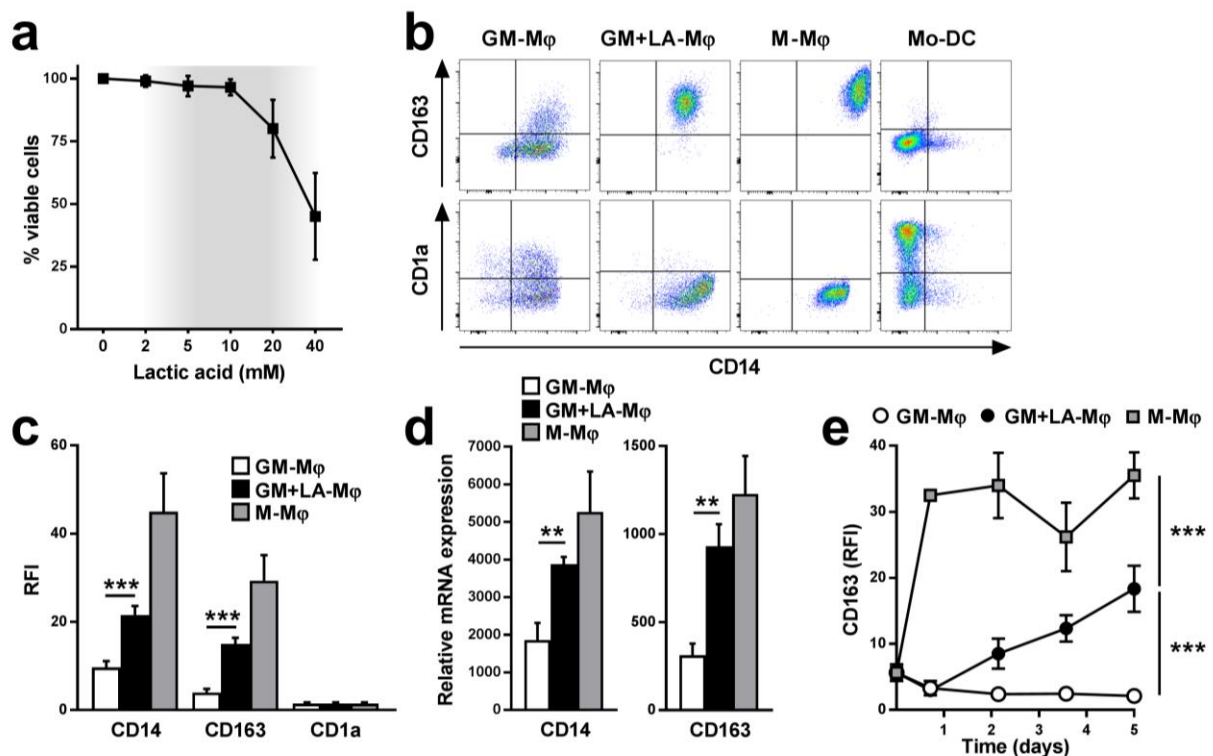


Figure 1. Lactic acid induces monocyte differentiation into CD14^{high} CD163^{high} macrophages. **a.** Human monocytes were cultured with GM-CSF and the indicated concentrations of LA. Results are expressed as a percentage of viable cells at day 5 (n=5); shaded area, range of LA concentrations in solid tumors (21);. **b&c.** CD1a, CD14 and CD163 expression was assessed by flow cytometry at day

5 on GM-M ϕ , GM+LA-M ϕ , M-M ϕ and Mo-DC. Results are expressed as RFI values (n=5) (b) or representative of one of 5 experiments (c). d. Relative expression of CD14 and CD163 mRNA at day 5 (n=3). e. The expression of membrane CD163 was evaluated by flow cytometry at the indicated time points (n=5). a,c-e. mean $\pm$ SEM; ** p<0.01, *** p<0.001 (Wilcoxon test or 2-way ANOVA).

The effects of LA depend on lactate entry into cells

Lactic acidosis results from the extracellular accumulation of lactate and protons that lowers the extracellular pH (27). We therefore evaluated whether the effects of LA on monocytes/macrophages could result from an adaptation to acidosis or lactosis. The differentiation of monocytes under acidosis (12.35 mM HCl, pH=6.5) or lactosis (10 mM sodium lactate, pH=7.3) did not affect CD163 and CD14 expression on day-5 macrophages (Fig. 2a, left panels).

The import of lactate into cells is mediated by monocarboxylic acid transporters (MCT) and requires a low extracellular pH (28). Since both lactosis and a low pH were necessary to switch GM-M ϕ into CD163^{high} CD14^{high} cells, we suspected that this process was dependent on lactate influx into cells. In support, the MCT inhibitor CHC (used at 125 μ M; (28)) and the specific MCT1 inhibitor AZD3965 (used at 1.25 μ M; (36)) prevented the capacity of LA to upregulate CD14 and CD163 expression (Fig. 2a), suggesting that the impact of LA on macrophage polarization resulted from its intracellular entry. MCT inhibitors blocking lactate influx and efflux (Supplementary Fig. S2a), we then formally demonstrated lactate entry and metabolization by macrophages using ¹³C-labelled LA. NMR spectroscopy and LC-MS revealed the presence of ¹³C-metabolites in GM+LA-M ϕ and culture supernatants, among which malate, alanine and glutamate were the most abundant (Fig. 2b). In parallel, we also quantified glucose and lactate in the supernatants of GM-M ϕ and GM+LA-M ϕ during the differentiation process (Supplementary Fig. S2b). As expected (37), GM-M ϕ consumed glucose and released lactate. GM+LA-M ϕ were less glycolytic and consumed less glucose than GM-M ϕ (Supplementary Fig. S2b). For GM+LA-M ϕ , extracellular lactate levels correspond to non-consumed exogenous lactate and endogenous LA released by glycolysis. Supporting our above observations, extracellular lactate quantification at day 3 showed a consumption of exogenous lactate by GM+LA-M ϕ (Supplementary Fig. S2b). Finally, mitochondrial respiration demonstrated that, compared to GM-M ϕ (37), GM+LA-M ϕ had a reduced electron chain activity with still functional mitochondria (Supplementary Fig. S2c).

The data show that (i) the increase of CD14 and CD163 expression induced by LA depend on its entry into cells and (ii) is metabolized by human macrophages.

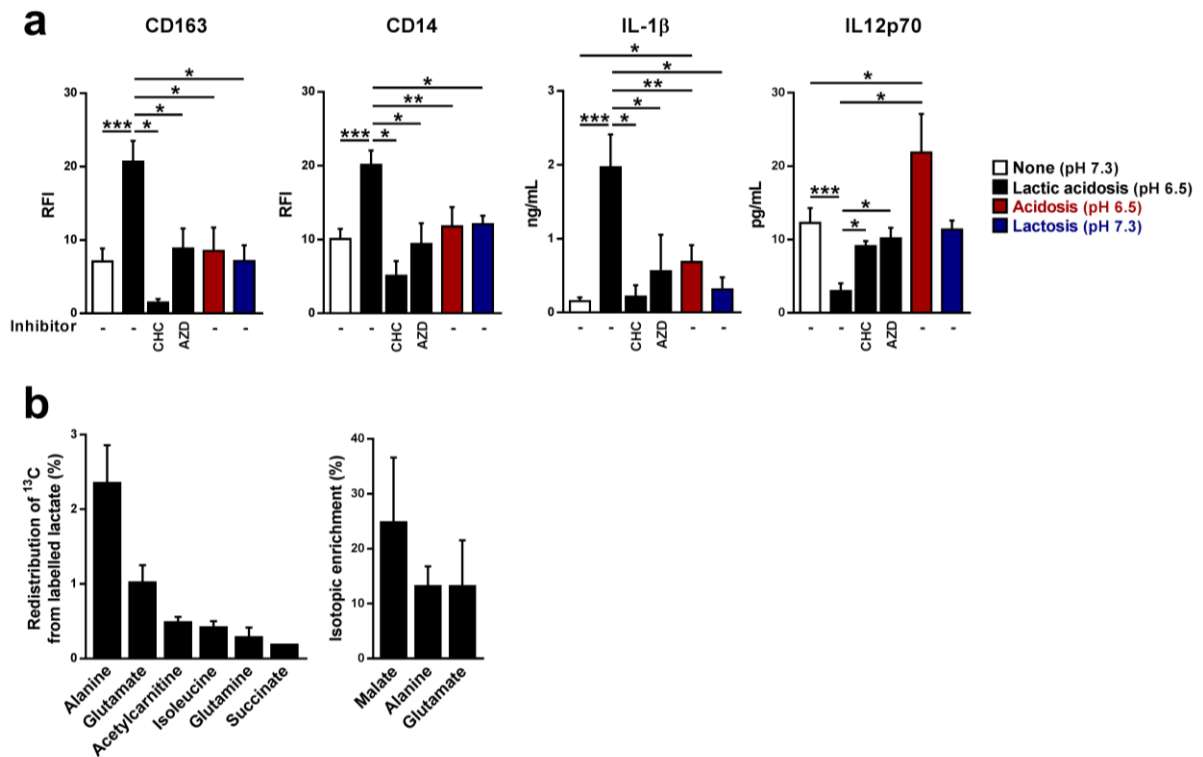


Figure 2. The effects of lactic acid are dependent on its internalization and metabolism. a. Human monocytes were generated under acidosis, lactosis or lactic acidosis, without or with CHC or AZD3965 (AZD). The expression of CD163 and CD14 was assessed by flow cytometry at day 5 (left panels) and IL-1 β and IL-12p70 were quantified after 24 h stimulation with LPS (right panels) (n=5). **b.** Monocytes were cultured with GM-CSF and 10 mM ^{13}C -lactate sodium (pH=6.5); samples were analyzed at day 5 by NMR (left panel, n=3) and LC-MS (right panel, n=4). LC-MS, results are expressed as a percentage of ^{13}C isotopic enrichment. **a-c.** mean $\pm$ SEM; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Wilcoxon test).

GM+LA-M ϕ harbour a non Th1-promoting inflammatory phenotype

Damage-associated molecules that signal via TLR4 accumulate in tumors (38). We therefore analyzed the cytokine profile of GM+LA-M ϕ in response to the prototypic TLR4 agonist LPS.

As expected (32,39), LPS-stimulated GM-M ϕ exhibited an IL-10^{low} IL-12p70^{high} M1-type phenotype and produced high levels of inflammatory cytokines (Fig. 3a). Surprisingly, stimulated GM+LA-M ϕ produced dramatically higher levels of IL-1 β , IL-6, TNF α and CXCL8 than stimulated GM-M ϕ , while maintaining a low production of IL-10 (Fig. 3a). The upregulation of IL-6 and TNF α production by GM+LA-M ϕ was homogeneous among the CD14^{high} CD163^{high} cell population, allowing excluding that the IL-6^{high} TNF α ^{high} phenotype may result from the coexistence of distinct subpopulations (Fig. 3b). In parallel, GM+LA-M ϕ , stimulated or not, exhibited an upregulation of

the transcripts encoding IL-1 β , TNF α and IL-6, and several chemokines, including CCL2, CCL13 and CXCL5 (involved in myeloid cell recruitment), CXCL8 (involved in neutrophil recruitment) and CXCL2 and CXCL3 (which favors angiogenesis) (Fig. 3c); most of these chemokines are present in tumor sites and are associated with a poor prognosis (40).

Unlike GM-M ϕ , GM+LA-M ϕ did produce low levels of the Th1-inducing factor IL-12p70 and did not produce the Th1-attracting chemokine CXCL10 (Fig. 3a). In support, DC generated in the presence of LA also lack the ability to produce IL-12 (24). GM+LA-M ϕ also expressed higher levels of CXCL1 and CCL18 (involved in the recruitment of immunosuppressive myeloid cells) and of CCL24 (involved in naive and resting T cell recruitment) than GM-M ϕ (Fig. 3c).

Again, the capacity of LA to induce IL-1 β ^{high} IL-12^{low} macrophages was dependent on its entry into cells as it was prevented by MCT inhibitors (Fig. 2a) and not mimicked by acidosis. Indeed, and in agreement with previous studies (41,42), monocyte differentiation under acidosis dramatically increased the ability of macrophages to secrete IL-12p70 and IL-1 β , although at a lower extent than with LA (Fig. 2a). Finally, lactosis did not modulate IL-1 β and IL-12p70 secretion by macrophages (Fig. 2a).

Collectively, these results show that LA induces unconventional pro-inflammatory macrophages (i. e. non-pro-Th1), a phenotype compatible with chronic inflammation and an ineffective adaptive immune response, as observed in established tumors (6).

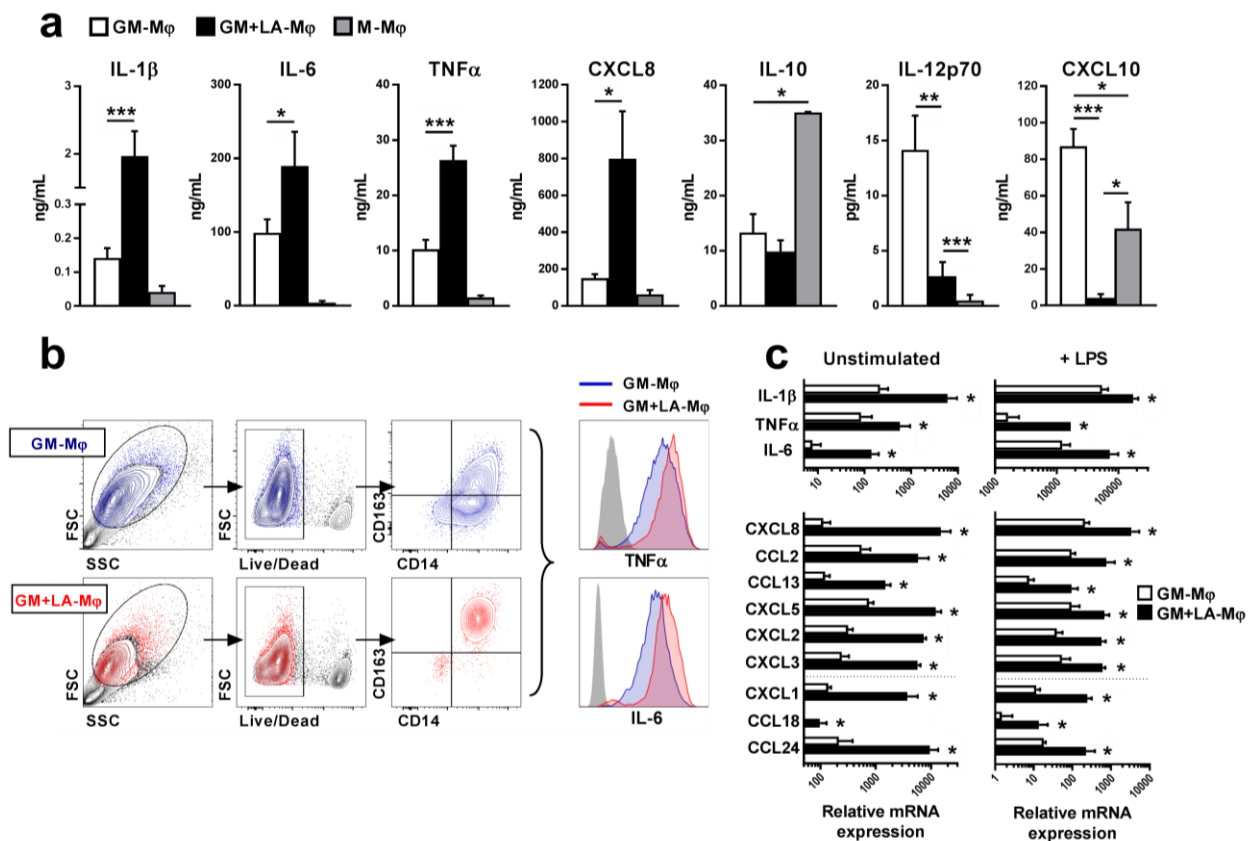


Figure 3. Lactic acid confers an inflammatory phenotype to human macrophages. **a.** Day-5 macrophages were stimulated with LPS for 24 h before quantification of IL-1β, IL-6, TNFα, CXCL8, IL-10, IL-12p70 and CXCL10 (n=7). **b.** Day-5 GM-Mφ (blue) and GM+LA-Mφ (red) were stimulated for 24 h with LPS before intracellular staining with anti-TNFα and anti-IL-6 mAbs. Dot plots, gating strategy; histograms, levels of TNFα and IL-6 (grey histograms, isotype control mAbs). Results are representative of one of 5 experiments. **c.** Relative expression of IL-1β, TNFα, IL-6 (upper panels), CXCL8, CCL2, CCL13, CXCL5, CXCL2, CXCL3, CXCL1, CCL18 and CCL24 (lower panels) mRNA by day-5 macrophages either unstimulated (left panel) or stimulated for 6 h with LPS (right panel) (n= 3). **a,c.** mean ± SEM; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Wilcoxon test).

Lactic acid-induced macrophages secrete tumor-promoting factors

TAM are a major source of growth factors (6). We thus evaluated the capacity of GM+LA-Mφ to produce pro-tumor factors. Compared to GM-Mφ, GM+LA-Mφ expressed high levels of transcripts encoding (i) the EGFR ligands HB-EGF, TGFα and epiregulin, (ii) the epithelial growth factors HGF and IL-20, (iii) the epithelial-mesenchymal transition factor OSM and (iv) the endothelial and mesenchymal cell proliferation and migration factors VEGF-A and PDGF-BB (Fig. 4a). Accordingly, stimulated GM+LA-Mφ produced higher levels of HB-EGF, TGFα, IL-20, OSM,

VEGF-A and ET-1 than GM-M ϕ (Fig. 4b). Most of these factors are expressed by TAM in established tumors and are associated to tumor growth and metastasis (43).

Interestingly, this pro-tumor signature induced by LA was distinct from that of the prototypic M2 and M2-like cells (M-M ϕ). More precisely, GM+LA-M ϕ produced higher levels of HB-EGF, TGF α and ET-1 and lower levels of VEGF-A than M2 and M2-like cells (Fig. 4b). Moreover, the expression of most of the IL-4-induced M2 transcripts (44) was not upregulated by LA (Supplementary Fig. S3a). These results show that LA promotes the generation of macrophages with a unique phenotype combining inflammatory and tumor trophic features.

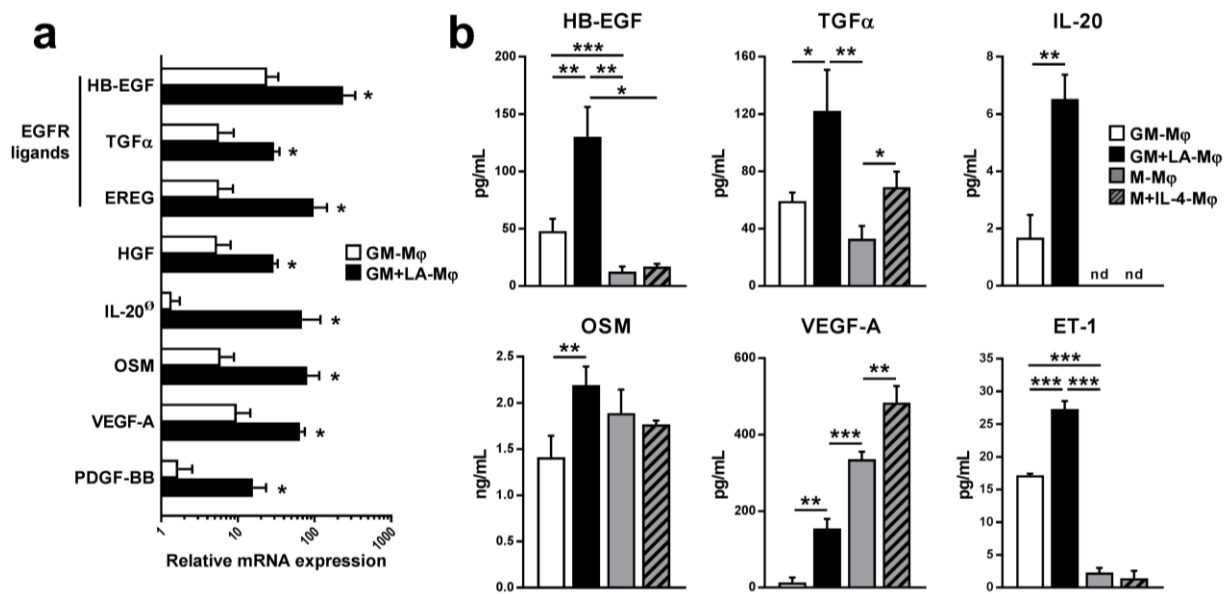


Figure 4. Lactic acid induces the generation of macrophages with trophic properties. **a.** Relative HB-EGF, TGF α , EREG, HGF, IL-20, OSM, VEGF-A and PDGF-BB mRNA expression at day 5 (n=3). ⁰, 6 h stimulation with LPS. **b.** Day-5 macrophages were stimulated for 24 h with LPS before quantification of HB-EGF, TGF α , IL-20, OSM, VEGF-A, and ET-1. nd, not done. **a&b.** mean $\pm$ SEM, n=6; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Wilcoxon test).

Lactic acid enhances autocrine M-CSF consumption by differentiating myeloid cells

We observed that GM+LA-M ϕ exhibited an upregulation of several mRNA, such as SERPINB2, FOLR2, SEPP1 and CD163 which are defined as M-CSF-induced genes (Fig. 5a&b) (39). In agreement with studies showing that GM-CSF, by downregulating CD115 expression, limits M-CSF consumption and, consequently, the expression of M-CSF-induced genes by monocytes (32,45-47), we observed an accumulation of autocrine M-CSF in the culture supernatants of GM-M ϕ (Fig. 5c).

Based on these observations, we hypothesized that LA could promote autocrine M-CSF consumption by differentiating M ϕ . Different evidences support this hypothesis. First, compared to GM-M ϕ , GM+LA-M ϕ exhibited (i) an early increase of CD115 mRNA (Supplementary Fig. S4a), (ii) an increase of membrane CD115 expression at 6 h and 24 h (that returned to levels similar to GM-M ϕ at 48 h) (Fig. 5d, left panel) and, (iii) a reduction of sCD115 release (Fig. 5d, right panel), while total CD115 expression remained unchanged (Supplementary Fig. S4b). Second, the expression of M-CSF mRNA was increased in GM+LA-M ϕ (Supplementary Fig. S4a), whereas M-CSF remained undetectable in their culture supernatants (Fig. 5c). Third, the CD115 tyrosine kinase inhibitor GW2580 (48), and a neutralizing anti-M-CSF mAb (49), but not a control mAb, prevented the generation of CD163^{high} CD14^{high} macrophages induced by LA (Fig. 5e). GW2580 also decreased the expression of the M-CSF-dependent genes SERPINB2, FOLR2, SEPP1 and CD163 (Fig. 5b) and the secretion of VEGF-A and TGF α by GM+LA-M ϕ (Fig. 5f). Fourth, flow cytometry analysis revealed that the level of phosphorylation of ERK1/2, which is induced by M-CSF and LA (50), was increased in GM+LA-M ϕ compared to GM-M ϕ (Supplementary Fig. S4c).

Of note, the observation that the acquisition of an inflammatory signature was also dependent on an autocrine consumption of M-CSF during the differentiation process (as illustrated by the decrease of IL-1 β and TNF α production by GM+LA-M ϕ in the presence of GW2580; Fig. 5f) was surprising as M-M ϕ are not inflammatory cells (39). However, supporting our observations, macrophages generated with GM-CSF, M-CSF and IL-6 (GM+M-M ϕ) exhibited an IL-1 β ^{high}, VEGF-A^{high} and CD163^{high} phenotype similar to GM+LA-M ϕ (Supplementary Fig. S4d). This result is consistent with the fact that IL-6 unlocks M-CSF consumption by myeloid cells (32,45). Finally, the phenotype of GM+LA-M ϕ cannot be solely recapitulated by the consumption of M-CSF. First, GW2580 did not modulate the secretion of OSM, HB-EGF, IL-12p70 and CXCL10 by GM+LA-M ϕ (Supplementary Fig. S4e). Second, GM+M-M ϕ produced lower levels of HB-EGF than GM+LA-M ϕ (Supplementary Fig. S4d). Third, in the absence of GM-CSF, we failed in detecting any effect of LA when monocytes were differentiated in the presence of M-CSF (Supplementary Fig. S3b).

In conclusion, LA induces autocrine consumption of M-CSF by monocytes exposed to GM-CSF and this mechanism may explains the acquisition of certain inflammatory and trophic features.

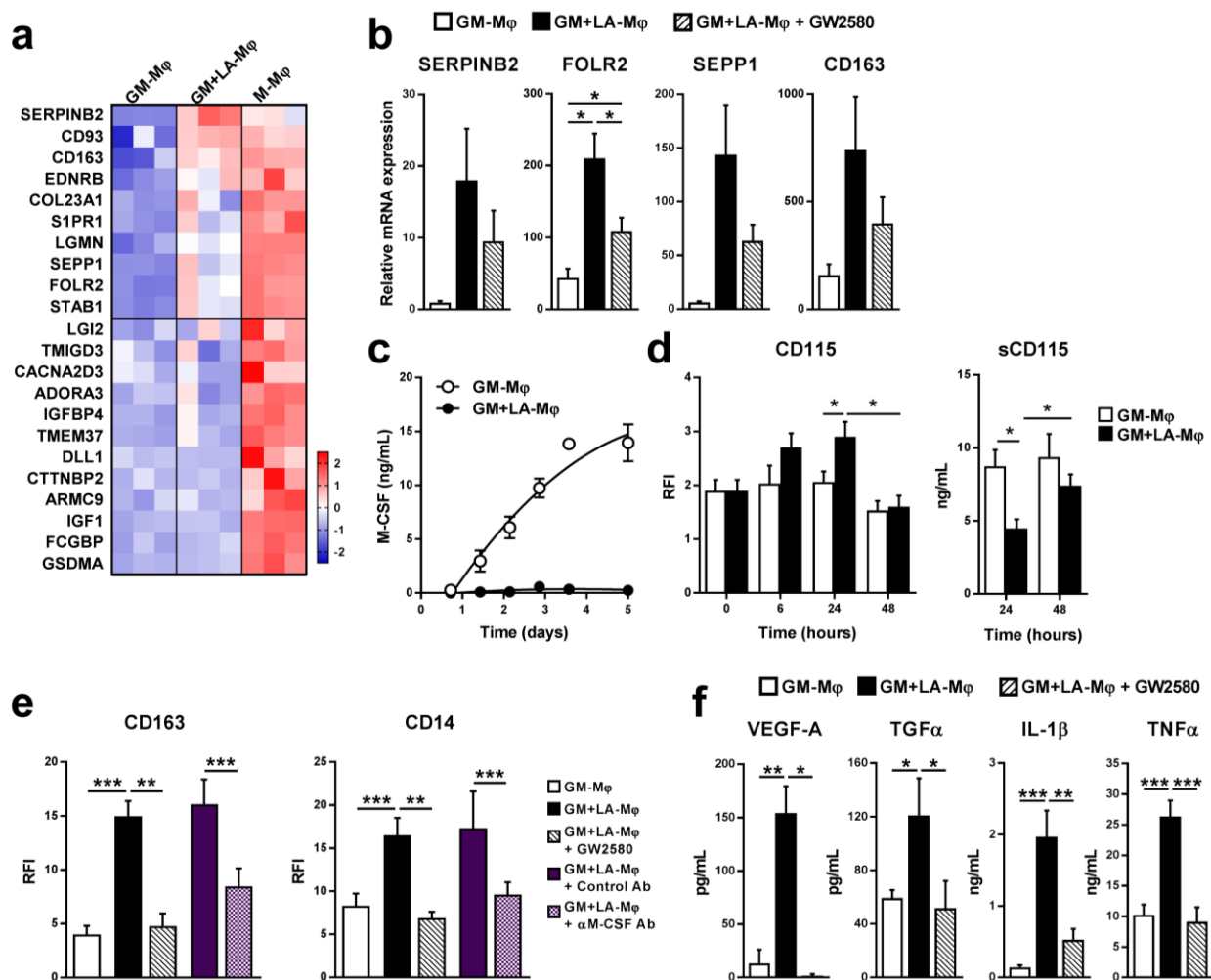


Figure 5. The expression of selected markers by GM+LA-Mφ is dependent of autocrine M-CSF consumption. **a.** Relative mRNA expression in day-5 GM-Mφ, GM+LA-Mφ and M-Mφ (3 different donors). The normalized values are represented as a heat-map using a color scale where blue and red represent expression above and below the mean, respectively. **b.** GM-Mφ and GM+LA-Mφ were generated without or with GW2580 and the relative expression of SERPINB2, FOLR2, SEPP1 and CD163 mRNA expression was determined at day 5. **c.** M-CSF quantification in the supernatants collected at indicated time point (n=5). **d.** CD115 expression (left panel) and sCD115 production (right panel) were determined at the indicated time points (n=3). **e&f.** GM-Mφ and GM+LA-Mφ were generated without or with a neutralizing anti-M-CSF mAb, a control mAb or GW2580. **e.** At day 5, the expression of CD163 and CD14 was determined (n= 4). **f.** Day-5 cells were stimulated for 24 h with LPS and VEGF-A, TGFα, IL-1β and TNFα were quantified in the supernatants (n=5). **b-e.** mean ± SEM; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Wilcoxon test).

The acquisition of the GM+LA-M ϕ phenotype depends on HIF-1 stabilization and lactate metabolism

Lactate is a potent inhibitor of cytoplasmic prolyl hydroxylases that degrade the transcription factor HIF-1 α (51). Accordingly, LA increases the expression of M2 genes by murine macrophages through the stabilization of HIF-1 α (28). Consistent with this result, we observed that the HIF-1 α inhibitor acriflavin (52) decreased LA-induced expression of M-CSF mRNA and, as previously reported in mice (53), of CD115 mRNA (Fig. 6a), supporting a role for HIF1- α in autocrine M-CSF consumption by human GM+LA-M ϕ . Acriflavin also prevented the upregulation of CD14 and CD163 (Fig. 6b) and of M-CSF-dependent marker expression (Fig. 6c) as well as the production of IL-1 β , TNF α , HB-EGF and OSM induced by LA (Fig. 6d).

Different studies have reported that the stabilization of HIF-1 α induced by lactate requires its oxidation to pyruvate (54-56). In agreement with these studies, the LDH inhibitors oxamic acid and GSK2837808A prevented the capacity of LA to increase CD163 and CD14 expression and IL-1 β and HB-EGF production by GM+LA-M ϕ (Fig. 6e).

These results show that the acquisition of the GM+LA-M ϕ phenotype by monocytes depends on lactate metabolism and HIF-1 stabilization.

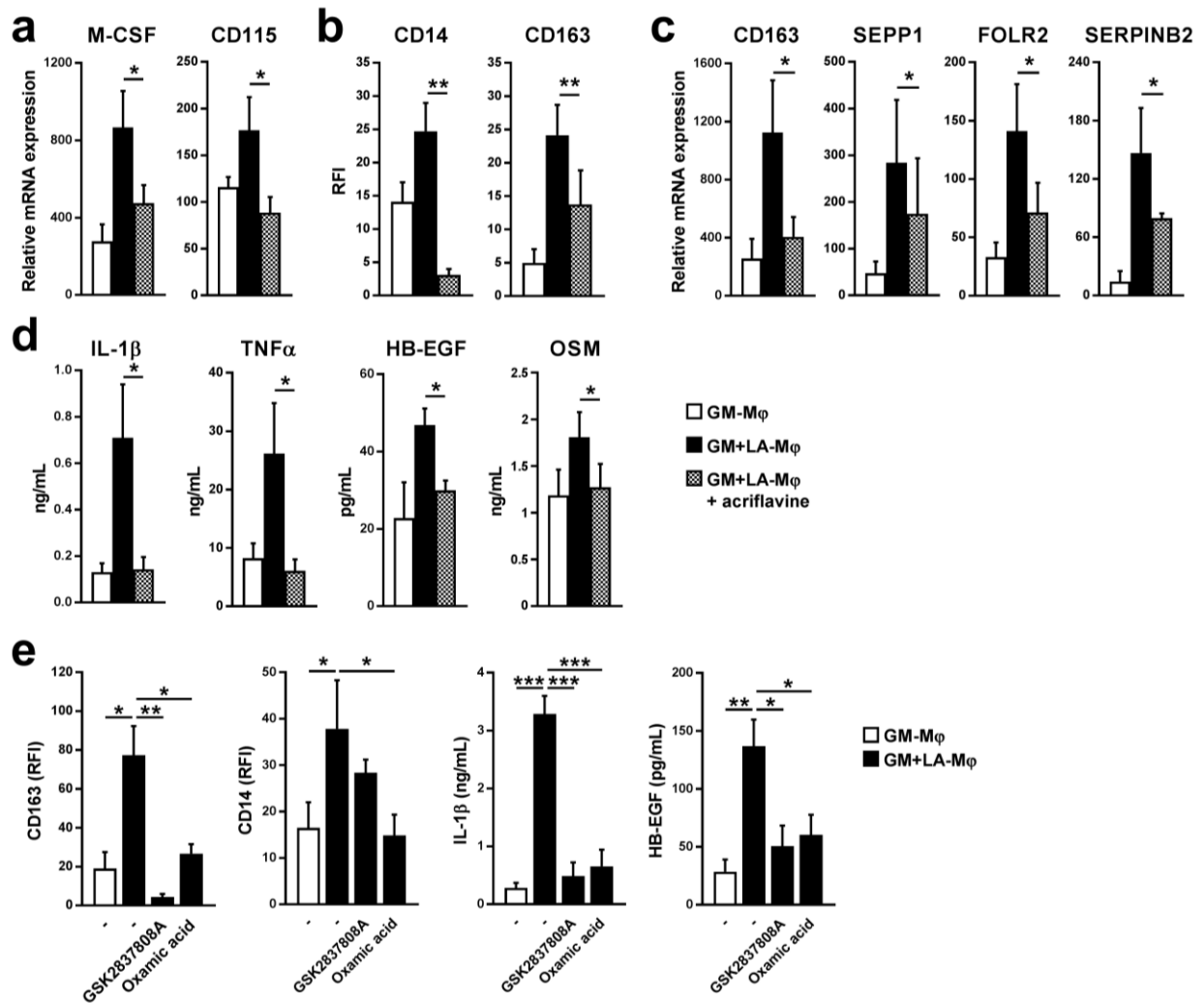


Figure 6. HIF-1 stabilization and LA metabolization in GM+LA-M ϕ . **a.** The relative expression of M-CSF and CD115 mRNA was determined in monocytes cultured for 18 h with GM-CSF or GM-CSF plus LA, without or with acriflavine (n=5). **b-d.** GM-M ϕ and GM+LA-M ϕ were generated without or with acriflavine. The expression of CD163 and CD14 (**b**) and the relative expression of CD163, SEPP1, FOLR2 and SERPINB2 mRNA (**c**) were determined at day 5 (n=5). **d.** Day-5 macrophages were stimulated for 24 h with LPS and IL-1 β , TNF α , HB-EGF and OSM were quantified in cell culture supernatants. **e.** GM+LA-M ϕ were generated without or with GSK2837808A and oxamic acid. The expression of CD14 and CD163 was determined at day 5 (left panels) and the production of IL-1 β and HBEGF was evaluated after a 24 h stimulation with LPS (right panels) (n=5).

Ovarian tumor TAM exhibit a unique pro-inflammatory and trophic phenotype

In order to evaluate the role of tumor-derived LA on monocyte differentiation, we cultured monocytes with LA-producing primary ovarian tumor cells (Supplementary Fig. S1a). Macrophages

generated in the presence of these tumor cells exhibited elevated levels of CD163, CD14 and IL-1 β (Fig. 7a and Supplementary Fig. S1b) and of SEPP1, FOLR2, STAB1, EREG and OSM (Fig. 7b). These effects were prevented by CHC (Fig. 7a&b and Supplementary Fig. S1b). Interestingly, the three primary tumor cells induced similar phenotypes, irrespective of their capacity to produce M-CSF and IL-6 (Supplementary Fig. S1a).

We next evaluated whether TAM present in solid ovarian tumors may exhibit a phenotype similar to GM+LA-M ϕ . We monitored the expression of (i) VEGF, as VEGF^{high} TAM are localized in LA-rich zones (29,57) and (ii) of the inflammatory cytokines CXCL8 and IL-1 β in LPS-stimulated cell suspensions (obtained after tumor dissociation). We detected three subsets of CD14⁺ cells: CXCL8⁻ IL-1 β ⁻ VEGF⁺, CXCL8⁺ IL-1 β ⁻ VEGF⁺ and CXCL8⁺ IL-1 β ⁺ VEGF⁺ (Fig. 7c). Interestingly, the highest levels of VEGF were detected in TAM producing CXCL8 and IL-1 β (Fig. 7d), as observed in GM+LA-M ϕ (Fig. 5f).

Collectively, these results demonstrate, for the first time, the existence of human TAM with pro-tumor and inflammatory features in ovarian tumors and highlight the central role of tumor-derived LA in their generation.

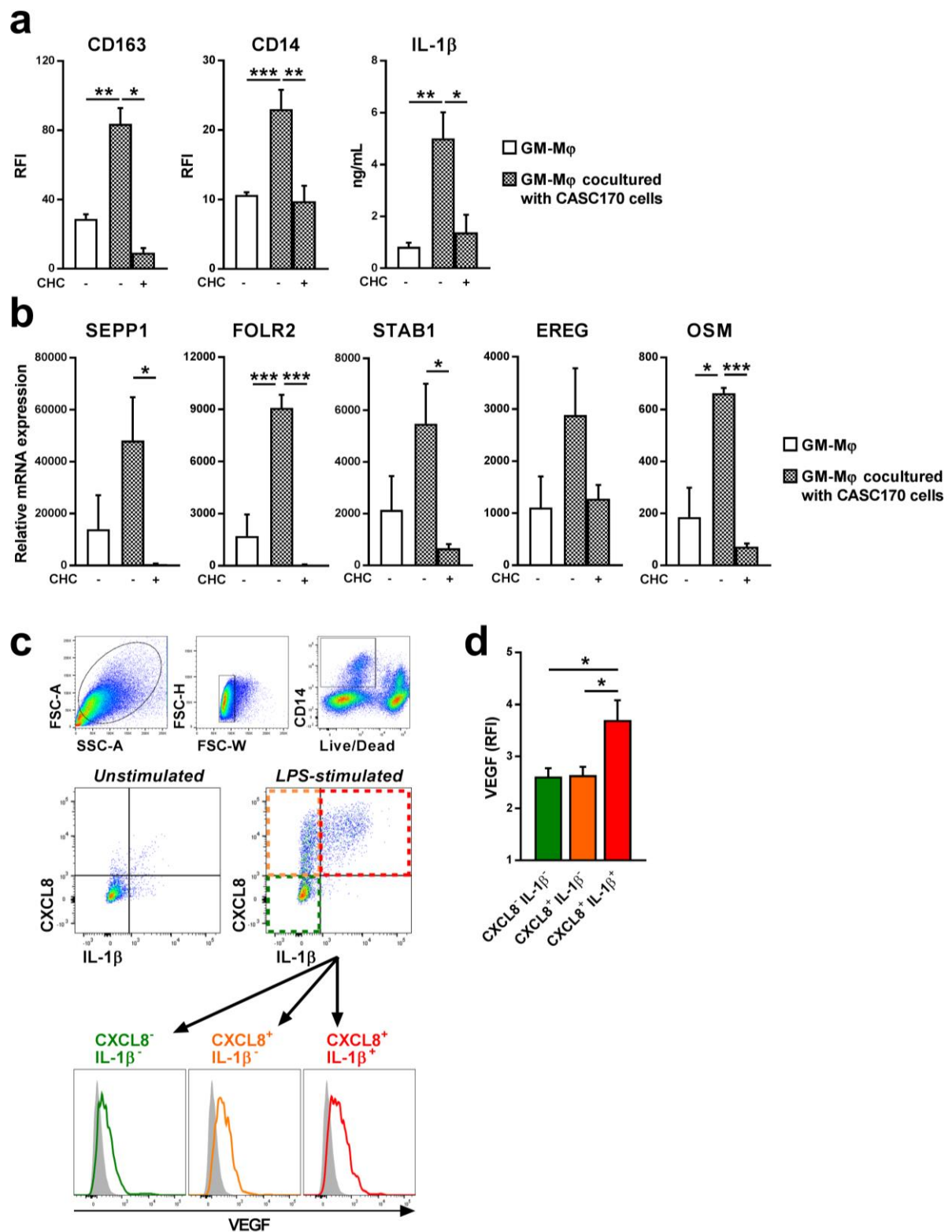


Figure 7. Ovarian tumor cell-derived LA induces the generation of macrophages expressing inflammatory and pro-tumor mediators. Monocytes were co-cultured for 5 days with GM-CSF (GM-M ϕ), in the absence or presence of the primary ovarian tumor cell CASC170, with or without CHC. **a.** The expression of CD163 (left panel) and CD14 (middle panel) was evaluated at day 5. Day-5 macrophages were stimulated for 24 h with LPS before quantification of IL-1 β (right panel) (n=4). **b.** The relative expression of SEPP1, FOLR2, SATB1, EREG and OSM mRNA was assessed after 6 h stimulation with LPS (n=4). **c.** LPS-stimulated or unstimulated cells suspension (after tumor dissociation) before intracellular staining with anti-CXCL8 and anti-IL-1 β mAbs. Dot plots represent the gating strategy and histograms the intracellular expression of CXCL8 and IL-1 β . Grey histograms, isotype control mAbs. Results are representative of one of 3 experiments. **d.** Relative expression of VEGF in CXCL8⁻ IL-1 β ⁻, CXCL8⁺ IL-1 β ⁻ and CXCL8⁺ IL-1 β ⁺ TAM from 4 patients. **a-d.** mean $\pm$ SEM; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Wilcoxon test).

Discussion

Most of the known macrophage-polarizing factors give rise to either trophic (M2) or inflammatory (M1) cells (5). Nevertheless, macrophages exhibiting M1- and M2-like features have been reported in different situations, especially in cancer (12,13). We report that a prolonged exposure to LA, whose excessive production is a major characteristic of tumors (21,27), confers to human macrophages a novel and unique phenotype combining inflammatory and pro-tumor features (Supplementary Fig. S5). The acquisition of this phenotype requires the internalization and metabolization of lactate and was dependent on HIF-1 stabilization and, for some factors, on M-CSF consumption. These results identify tumor-derived LA as a missing molecule reconciling the M2-like features of human TAM with their inflammatory properties.

We report that GM+LA-M ϕ produce numerous growth factors which promote tumor cell proliferation, migration and invasion and that this profile is closer to macrophages generated with M-CSF (5,39) than to prototypic M2 cells generated with IL-4 or IL-13 (44). Accordingly, LA has been reported to upregulate the expression of M2-type genes in mouse macrophages, independently of IL-4 (28). Furthermore, while M-CSF is overexpressed in numerous solid tumors (58-60), IL-4 and IL-13 are detected in a limited number of cancers (4,61). In addition to trophic properties, TAM also contribute to persistent inflammation (6). We show that GM+LA-M ϕ exhibit a strong inflammatory phenotype, as illustrated by a massive secretion of inflammatory cytokines and chemokines. Moreover, GM+LA-M ϕ produced low levels of CXCL10 and IL-12, involved in the recruitment of

CD8⁺ T cells and the generation of Th1 cells (40), respectively, and high levels of CCL18 which is involved in the recruitment of naive T cells that, ultimately, differentiate into Treg cells (62,63). Thus, through its impact on macrophages, LA produced by tumor cells could not only promote tumor growth but also sustain chronic inflammation without initiation of an effective anti-tumor immune response.

We show that GM+LA-Mφ acquire most of their characteristics through an autocrine consumption of M-CSF, a process which is finely regulated in human myeloid cells. For example, M-CSF accumulates in the cell culture supernatants of DC and M1-like macrophages (32,45,64) and its consumption is induced by IL-6 in differentiating cells (32,45,65). Our results show that LA also triggers M-CSF consumption via an increase of M-CSF and CD115 expression, a decrease of sCD115 release and an increase of CD115 downstream signalling. Whereas GM-CSF induces IL-10^{low} IL-1β^{high} TNFα^{high} cells, M-CSF induces anti-inflammatory IL-10^{high} IL-1β^{low} TNFα^{low} cells (32,39,66). M-Mφ being anti-inflammatory cells, we hypothesized that LA would dampen the inflammatory phenotype of GM-Mφ. Unexpectedly, GM+LA-Mφ exhibited a more pronounced inflammatory phenotype than GM-Mφ. Explaining this observation, the induction of M-CSF consumption by IL-6 amplifies the capacity of macrophages to produce pro-inflammatory cytokines. Accordingly, in chronic inflammatory situations, M-CSF exacerbates rather than dampens inflammation (15,67,68). Nevertheless, the phenotype of GM+LA-Mφ is not superimposable to that of GM+M-Mφ, confirming that the acquisition of this phenotype results from the integration of different signals.

The impact of LA on macrophage differentiation is dependent on its internalization and metabolization and requires HIF-1 stabilization. In support, it has been reported that, in murine macrophages, the expression of CD115 (53) and the induction of the M2 genes Arg1 and VEGF by LA (28) depend on HIF-1 stabilization. Since HIF-1 targets the expression of IL-1β and IL-6 mRNA (69), its stabilization can also directly induce an inflammatory phenotype in GM+LA-Mφ.

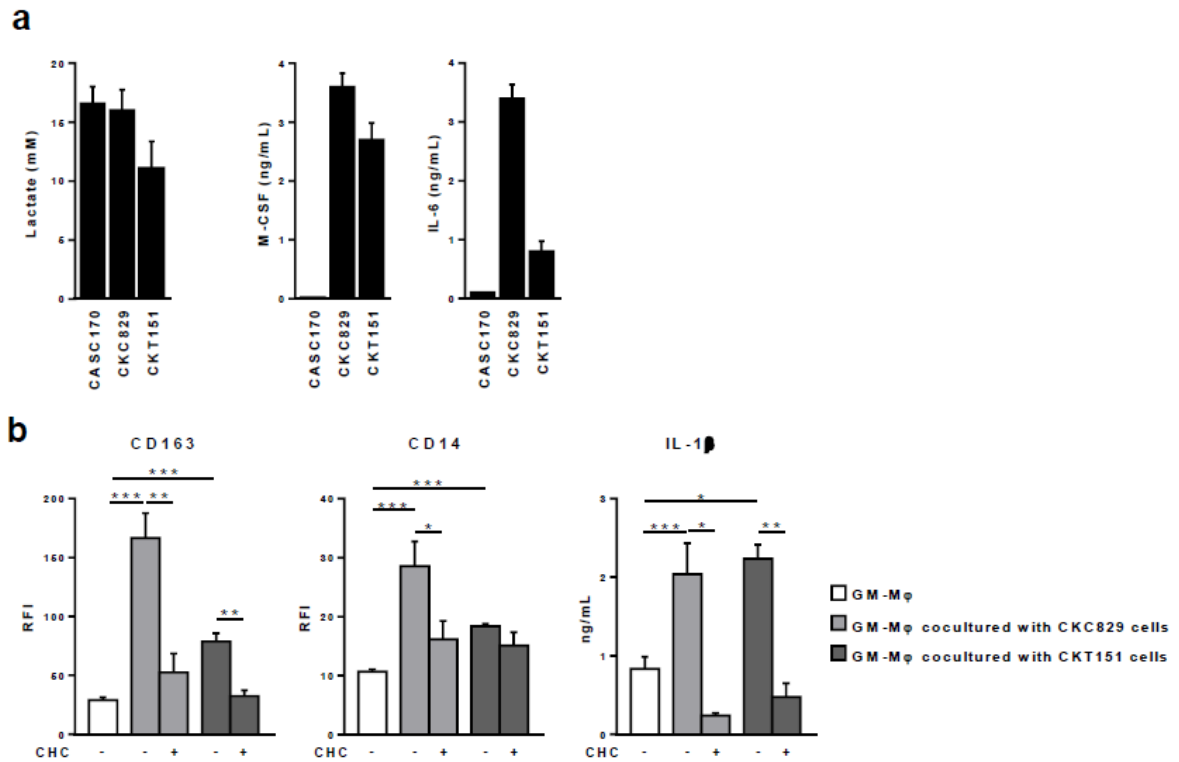
Accordingly, the phenotype of GM+LA-Mφ was not induced by lactosis or acidosis. While LA reduces IL-12 production, we observed, in agreement with others (41), that acidosis increases IL-12 secretion by human myeloid cells. Acidosis also increases IL-1β secretion by macrophages, but to a lower extent than LA.

Our results, together with these studies in mice (28-30), highlight the crucial role of tumor-derived LA in shaping the phenotype of human and mouse TAM. We show that tumor-derived LA induces inflammatory and pro-tumor macrophages in the presence of oxygen. Previous studies reported that VEGF^{high} TAM are localized in ischemic zones, characterized by hypoxia and high concentrations of

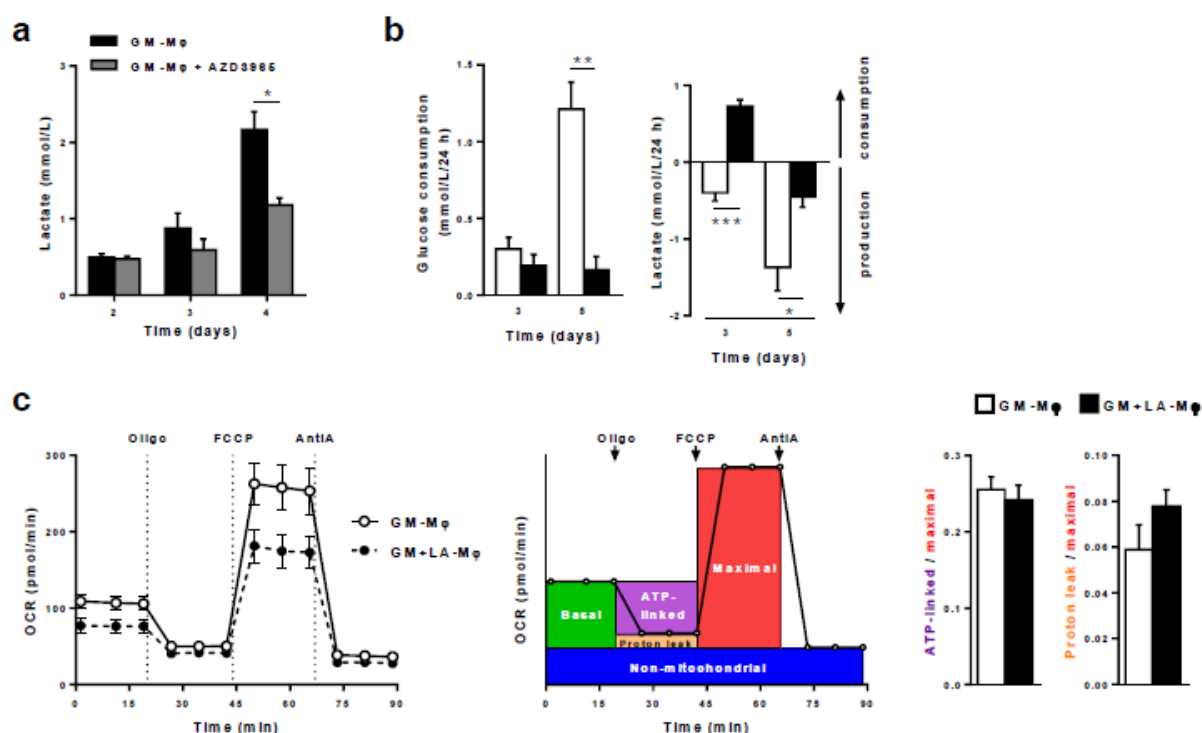
lactate (29,57). Although hypoxia synergizes with LA in inducing pro-angiogenic and -tumor TAM (28,29), hypoxia per se does not skew murine TAM towards a tumor-promoting phenotype (30,70). These studies and our results confirmed that, among tumor-derived metabolites, LA plays a pivotal role in inducing TAM. Finally, we report that TAM in solid ovarian tumors are functionally heterogeneous, some of them expressing a pronounced inflammatory and pro-tumor phenotype (IL-1 β ⁺ CXCL8⁺ VEGF⁺); it is likely that these TAM, which exhibit a phenotype close to GM+LA-M ϕ , are localized in/or near ischemic zones in ovarian cancers.

The crosstalk between LA, M-CSF and GM-CSF may have a therapeutic impact on cancer treatment. In the early stages of tumor development, GM-CSF participates in antitumor immune surveillance by inducing antitumor macrophages (71). By contrast, in advanced tumors, the levels of GM-CSF and M-CSF increase, and high levels of GM-CSF or M-CSF are associated with poor prognosis and metastasis (15). GM-CSF then favors the recruitment and accumulation of immunosuppressive myeloid cells and its neutralization reduces tumor growth (72-75). Similarly, M-CSF promotes monocyte recruitment and differentiation into M2-like cells (58,76). The ability of LA to induce, in the presence of GM-CSF, the consumption of M-CSF by monocytes/macrophages suggests that in vivo LA secreted by growing tumors will switches monocyte differentiation from M1 cells to inflammatory and trophic TAM. This contributes to explain the antagonistic roles of GM-CSF, according to the stages of tumor development (additional Figure S5). Finally, since M-CSF and LA act together to shape the phenotype of human TAM in established tumors, combination therapies to reduce tumor cell glycolysis and to neutralize M-CSF/CD115 could work synergistically to re-educate TAM into anti-tumor cells.

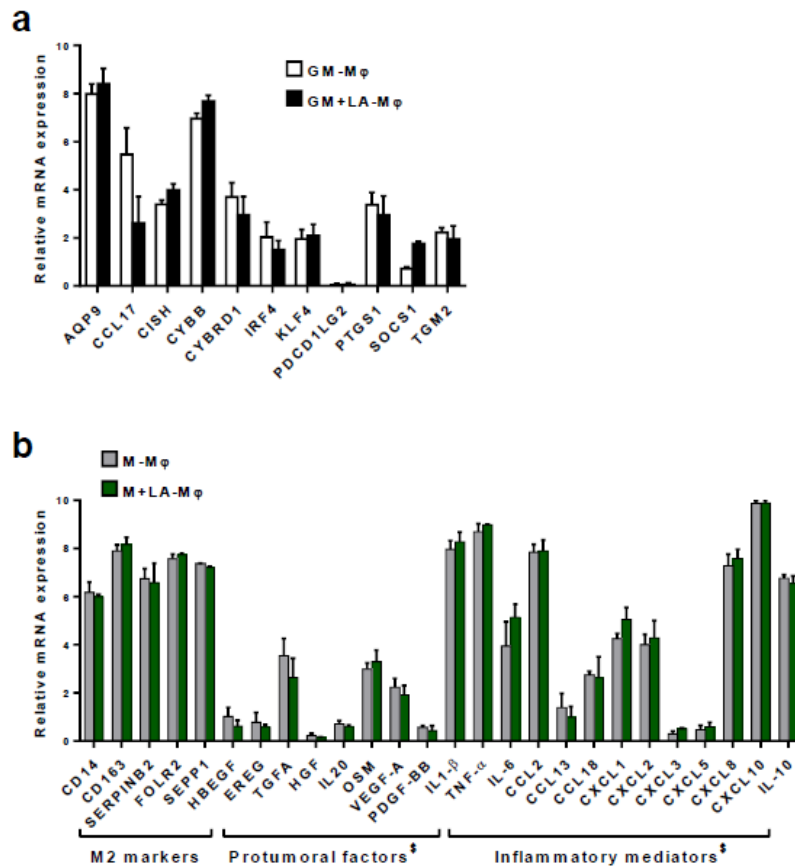
In conclusion, we demonstrate that LA confers to human macrophages a pro-tumor and inflammatory phenotype, underlining its central role in inducing persistent and unresolved cancer-related inflammation and sustaining tumor growth. These observations highlight the therapeutic interest of drugs that may dampen tumor glycolysis in order to re-program TAM and thereby boost the efficacy of immunotherapies.



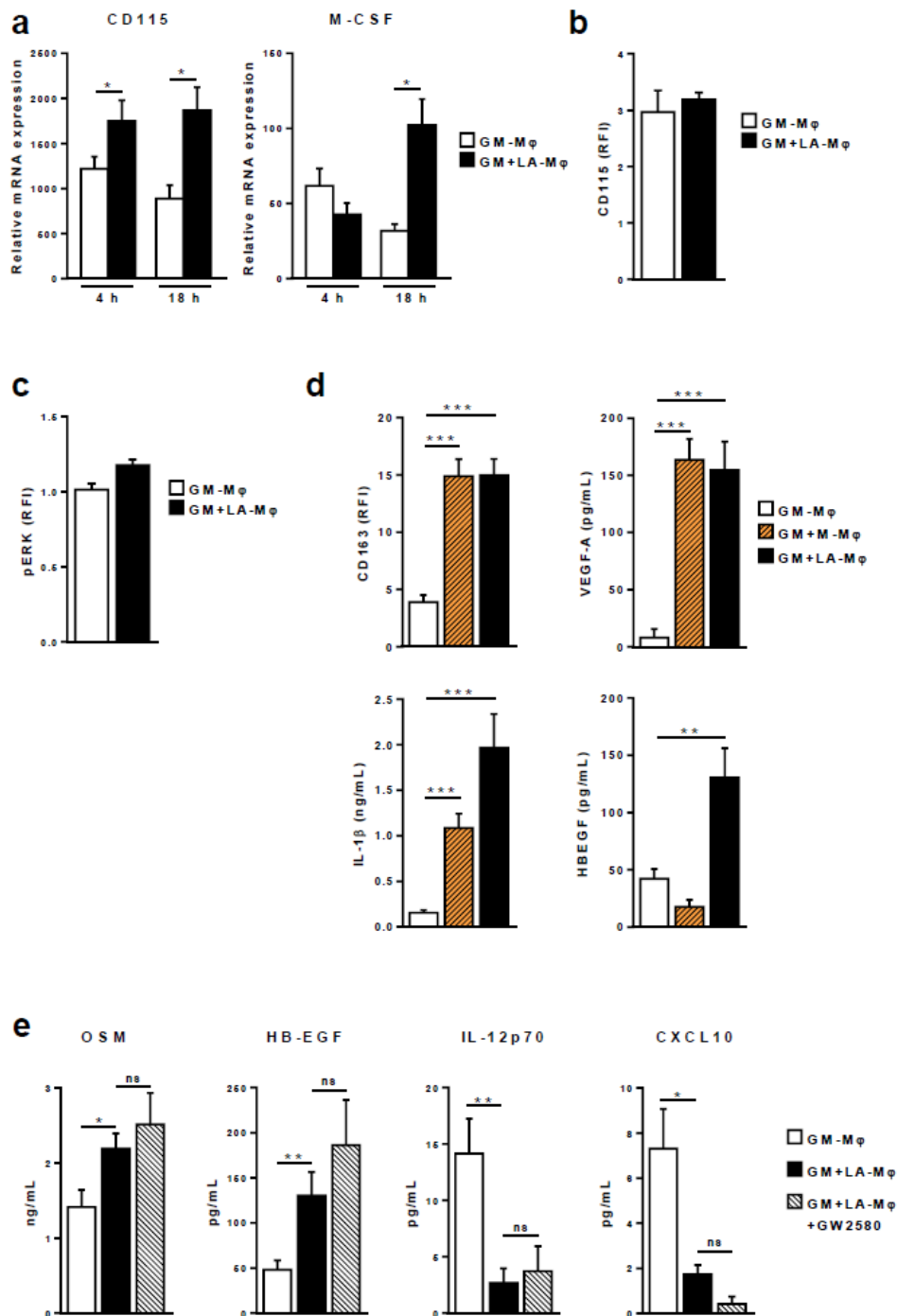
Supplementary Figure S1. The primary tumor cells CASC170, CKC829 and CKT151 were isolated from ascites of patients with high-grade serous ovarian carcinoma (Biological resource center, University Hospital of Rennes, Rennes, France; agreement BB-0033-00056) **a.** Primary tumor cells were cultured and lactate, M-CSF and IL-6 were quantified in day-4 supernatants. **b.** Monocytes were co-cultured for 5 days with 50 ng/mL GM-CSF in the absence (GM-Mφ) or presence of CKC829 (GM-Mφ co-cultured with CKC829 cells) or CKT151 cells (GM-Mφ co-cultured with CKT151 cells), without or with 125 μM CHC. The expression of CD163 and CD14 was evaluated by flow cytometry at day 5; IL-1β was quantified in supernatants of cells stimulated for 24 h with 200 ng/mL LPS. **a&b.** mean ± SEM; n=4. * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001 (Wilcoxon test).



Supplementary Figure S2. a. Monocytes were cultured with 50 ng/mL GM-CSF (GM-Mφ) or 50 ng/mL GM-CSF plus 1.25 μM AZD3965 (GM-Mφ + AZD). Lactate was quantified in cell culture supernatants at day 2, 3 and 4. Results are expressed in mmol/L (mean ± SEM, n=4). **b&c.** Monocytes were cultured with 50 ng/mL GM-CSF (GM-Mφ) or 50 ng/mL GM-CSF plus 10 mM lactic acid (GM+LA-Mφ). **b.** Glucose and lactate were quantified in cell culture supernatants at day 3 and day 5. Results are expressed in mmol/L/24 h where positive and negative values correspond to consumption and production, respectively (n=4). **c.** OCR was monitored at day 5 (n=7). OCR measured before and after the sequential addition of oligomycin (oligo), FCCP and antimycin A (AntiA). Metabolic parameters obtained from the OCR profiling, ATP-linked respiration / maximal respiration capacity, and proton leak / maximal respiration capacity are determined as described in the Supplementary Material and Methods. **a-c.** mean ± SEM; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Wilcoxon test).

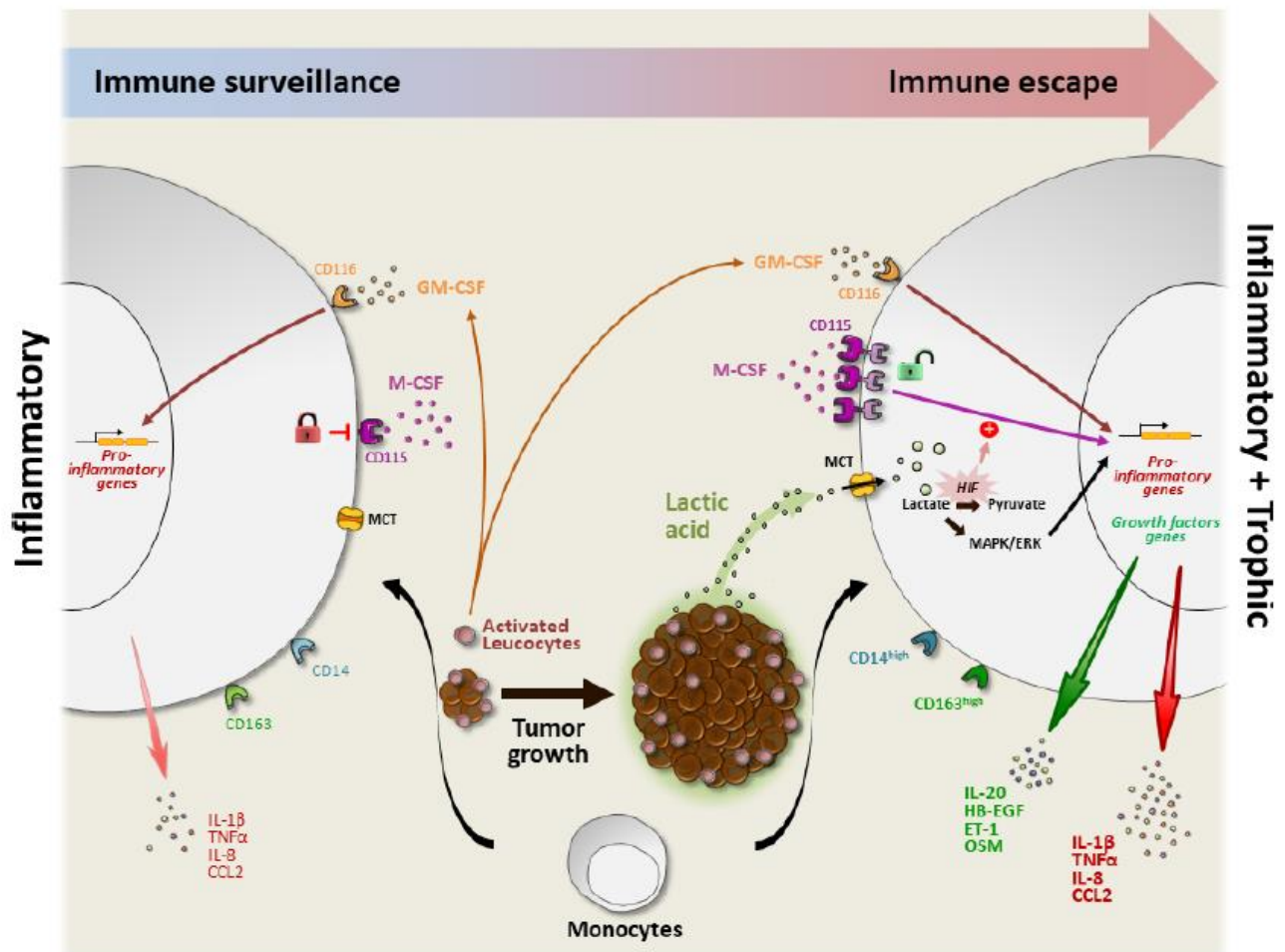


Supplementary Figure S3. a. Human monocytes were cultured for 5 days with 50 ng/mL GM-CSF (GM-Mφ) or 50 ng/mL GM-CSF plus 10 mM lactic acid (GM+LA-Mφ). At day 5, the relative expression of the mRNA encoding AQP9, CCL17, CISH, CYBB, CYBRD1, IRF4, KLF4, PDCD1LG2, PTGS1, SOCS1 and TGM2 was assessed by qPCR; specific gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using housekeeping genes as calibrator. Results are expressed as relative mRNA expression (n=3). **b.** Monocytes were cultured with 50 ng/mL M-CSF (M-Mφ) or 50 ng/mL M-CSF plus 10 mM lactic acid (M+LA-Mφ) for 5 days. At day 5, cells were stimulated (\$) or not for 6 h with 200 ng/mL LPS. The expression of the mRNA encoding CD14, CD163, SERPINB2, FOLR2, SEPP1, HB-EGF, EREG, TGFα, HGF, IL-20, OSM, VEGF-A, PDGF-BB, IL-1β, TNFα, IL-6, CCL2, CCL13, CCL18, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL10 and IL-10 was assessed by qPCR. Specific gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using housekeeping genes as calibrator. Results are expressed as relative mRNA expression (n=3). **a-b.** mean ± SEM



Supplementary Figure S4. **a.** Monocytes were cultured with 50 ng/mL GM-CSF (GM-Mφ) or 50 ng/mL GM-CSF plus 10 mM lactic acid (GM+LA-Mφ). **a.** The relative expression of the mRNA encoding CD115 and M-CSF was assessed by qPCR at indicated time points. Specific gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using housekeeping genes as calibrator; results are expressed as relative mRNA expression (n=3). **b.** The expression of CD115 (membrane and intracellular) was assessed by flow cytometry at 24 h (n=3). **c.** Cells were collected at day 2 and stimulated 20 min with 200 ng/mL LPS before analyzing the expression of pERK1/2 by flow cytometry (using PE-labeled anti-ERK1/2 phospho Thr202/Tyr204, clone 6B8B69, Biolegend). **d.** Human monocytes were cultured for

5 days with 50 ng/mL GM-CSF or 50 ng/mL GM-CSF plus 10 ng/mL M-CSF plus 150 ng/mL IL-6 (from Immunotools, Friesoythe, Germany) added at day 2 GM-M ϕ + M-CSF or GM-CSF plus LA (GM+LA-M ϕ). The expression of CD163 was assessed by flow cytometry at day 5 (left panel). Day-5 cells were stimulated for 24 h with 200 ng/mL LPS and VEGF-A, IL-1 β and HB-EGF were quantified in cell culture supernatants (n=4). **e.** Monocytes were cultured for 5 days with 50 ng/mL GM-CSF (GM-M ϕ) or 50 n/mL GM-CSF plus 10 mM lactic acid in the absence (GM+LA-M ϕ) or presence of 3 μ M GW2580 (GM+LA-M ϕ + GW2580). At day 5, cells were stimulated for 24 h with 200 ng/mL LPS before quantification of OSM, HB-EGF, IL-12p70 and CXCL10 by ELISA. Results are expressed in pg/mL or ng/mL (n=5). **a-e.** mean $\pm$ SEM; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 (Wilcoxon test).



Supplementary Figure S5. Schematic representation of the impact of LA on TAM phenotype. GM-CSF produced by activated leucocytes in nascent tumors promotes the generation of antitumor M1 cells that contribute to the elimination phase. Tumor growth results in lactate accumulation with subsequent extracellular pH acidification and is associated with M-CSF and GM-CSF overexpression in tumor microenvironment. Tumor-derived LA then skews monocyte differentiation into macrophage with potent inflammatory and trophic properties. This effect involves HIF stabilisation, lactate metabolism, MAPK/ERK pathway activation and is dependent on M-CSF consumption and on an acidic extracellular pH.

Supplementary Table 1. Analysis of cell viability.

Compounds	Function	Cell viability (%)	Reference
LA (10 mM)	-	95.0 ± 1.0	-
HCl (12.35 mM)	-	99.0 ± 34.2	-
Na-Lact (10 mM)	-	98.1 ± 1,6	-
LA (10 mM) + CHC (125 µM)	MCT inhibitor	88.6 ± 11.3	Colegio et al. <i>Nature</i> 2014
LA (10 mM) + AZD3965 (1.25 µM)	MCT inhibitor	91.3 ± 5.9	Polanski et al. <i>Clin Cancer Res</i> 2014
LA (10 mM) + acriflavine (1 µM)	HIF1- α inhibitor	91.4 ± 9.0	Lee et al. <i>PNAS</i> 2009
LA (10 mM) + GW2580 (3 µM)	CD115 inhibitor	90.2 ± 28.9	Conway et al. <i>PNAS</i> 2005
LA (10 mM) + α -M-CSF mAb (3 µg/mL)	Neutralizing α -M-CSF Ab	94.8 ± 16.4	Foucher et al. <i>PLoS One</i> 2013
LA (10 mM) + control mAb (3 µg/mL)	-	99.2 ± 13.5	-
LA (10 mM) + oxamic acid (30 mM)	LDH inhibitor	91.5 ± 5.8	Powers et al. <i>Biochem Mol Biol Educ</i> 2007
LA (10 mM) + GSK2837808A (80 µM)	LDH inhibitor	96.7 ± 15.4	Brighenti et al. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 2017

Effects of lactic acid (LA), HCl or sodium lactate (Na-Lact) in the presence of α -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC), AZD3965, acriflavine, GW2580, neutralizing anti-M-CSF mAb (α -M-CSF mAb), isotype control mAb (Control mAb), oxamic acid or GSK2837808A on the cell viability. Cell viability was assessed at day 5 by flow cytometry using 123count eBeads (Thermo Fisher Scientific) after staining with 7-AAD to discriminate dead cells from living cells. The results are represented as a percentage of living cells (mean ± SEM; n=3) relative to the control (untreated cells).

MCT, monocarboxylate transporter; HIF, hypoxia-induced factor; LDH, lactate dehydrogenase; MPC, mitochondrial pyruvate carrier.

Supplementary Table 2. Antibody listing.

Target	Fluorochrome	Clone	Source
CD14	FITC	TÜK4	Miltenyi Biotec
CD14	BV510	M5E2	BioLegend
CD163	APC	21597	R&D Systems
CD115	PE	61708	R&D Systems
TNFα	BV421	6401	R&D Systems
IL-6	PE	MQ2-13A5	Thermo Fisher Scientific
IL-1β	AF647	IK1B-1	BioLegend
CXCL8	PE-Cy7	EBN1	BioLegend
VEGF	PE	23410	BioLegend
ERK1/2 Phospho (Thr202/Tyr204)	PE	6B8B69	BioLegend

Supplementary Materials and Methods

Monocyte isolation and cell generation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy human volunteers (Blood collection center, Angers, France; agreement ANG-2017-01) by standard density-gradient centrifugation on Lymphocyte Separation medium (Eurobio, Courtaboeuf, France). CD14⁺ monocytes were then isolated by positive magnetic cell-sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); purity was routinely >98%. Monocytes (1×10^6 cells/mL) were cultured for 5 days in complete medium (CM) consisting in RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% FCS (Eurobio), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 10 mM Hepes, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all from Lonza) in the presence of 50 ng/mL M-CSF (ORF Genetics, Kopavogur, Iceland) to generate M-Mφ, or 50 ng/mL GM-CSF (R&D Systems, Lille, France) to generate GM-Mφ. Prototypic M2 cells (M+IL-4-Mφ) were generated by culturing monocytes in CM medium containing 50 ng/mL M-CSF for 5 days, with the addition of 50 ng/mL IL-4 (R&D Systems) at day 3. Monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) were generated by culturing monocytes for 5 days with 50 ng/mL GM-CSF and 50 ng/mL IL-4 in CM medium.

Lactic acidosis, acidosis and lactosis

Monocytes (1×10^6 cells/mL) were differentiated under lactic acidosis by culture for 5 days in CM with 50 ng/mL GM-CSF and 10 mM LA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) with a resulting pH of 6.5. In some experiments, 2-40 mM LA were used. In others, monocytes were cultured for 5 days in CM with GM-CSF plus 10 mM LA in the presence of 3 µM GW2580, 125 µM α -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC), 1 µM acriflavine, 5 mM oxamic acid (all from Sigma-Aldrich), 15 µM GSK2837808A (Tocris, Lille, France), 4 µg/mL neutralizing anti-M-CSF or isotype control mAbs (both from R&D Systems), or 1.25 µM AZD3965 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). All inhibitors were used at the highest non-toxic concentration (Supplementary Table 1). Monocytes were differentiated under acidosis by culture for 5 days in CM containing GM-CSF plus 12.35 mM HCl to reach a final pH of 6.5. Monocytes were differentiated under lactosis by culture for 5 days in CM containing GM-CSF plus 10 mM sodium lactate (Sigma-Aldrich) (pH=7.3).

Cytokine quantification

Cells were counted by flow cytometry using 123count eBeads (Thermo Fisher Scientific) after staining with 7-AAD or LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Molecular Probes, Carlsbad, CA) to discriminate dead cells from living cells at the end of the 5-7 days culture.

Macrophages (0.5×10^6 living cells/mL) were stimulated with 200 ng/mL LPS (from *E. coli* serotype O111:B4; Sigma-Aldrich) in fresh CM (to avoid interference in cytokine quantification due to acidic pH). Cytokines were quantified in the 24 h cell culture supernatants by fluorescent-bead-based multiplex immunoassay (R&D System), except IL-12p70 (Diacclone; Dijon, France), endothelin-1 and IL-20 (both from R&D Systems) which were quantified using conventional ELISA; IL-20 was quantified in 5-fold concentrated supernatants using Amicon Ultra centrifugal filters (Merck Millipore, Burlington, MA). Soluble CD115 (sCD115) and M-CSF were quantified by ELISA (R&D Systems) in the supernatants of monocytes cultured without or with 10 mM LA; LA did not interfere with CD115 and M-CSF quantification (not shown).

Flow cytometry analysis

In order to discriminate dead cells from living cells, all samples were stained with LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit (Molecular Probes) before flow cytometry analysis using anti-CD1a, anti-CD14, anti-CD163 or anti-CD115 mAbs. Intracellular cytokine and pERK1/2 expression was evaluated on day-5 macrophages stimulated for 24 h with LPS (in the presence of monensin for the last 6 h; BD Bioscience) or on dissociated ovarian cancer cells stimulated or not for 6 h with 50 ng/mL LPS (in the presence of monensin). Briefly, cells were fixed (4% PFA in PBS) and permeabilized (0.1% saponin in PBS containing 0.1% BSA) before incubation with anti-TNF α and anti-IL-6 mAbs. The expression of IL-1, CXCL8 and VEGF was also evaluated in activated ovarian cancer TAM. After mechanical and enzymatic dissociation, cells were stimulated or not for 6 h with 50 ng/mL LPS in the presence of monensin. After membrane permeabilization, cells were incubated with anti-IL-1 β , anti-CXCL8, anti-VEGF or anti-CD14 mAbs and related control mAbs (all from BioLegend, San Diego, CA). Data were acquired using a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed with the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Results are expressed as relative of fluorescence intensity (RFI) defined as the ratio of specific fluorescence (MFI values with specific mAb) over non-specific fluorescence (MFI values with isotype control mAbs) or as a percentage of labeled cells.

Analysis of mRNA expression

After cell lysis using Trizol reagent (Life technologies), total RNA were extracted using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed using the Superscript II reverse transcriptase (Life technologies). The expression of the mRNA encoding the indicated proteins was analyzed by qPCR. Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using RPS18, EF1A, TBP, RPL13A and PPIA as references, as previously described (32). The calculation method is based on the conversion of the linear Cq values into a logarithmic scale using the efficiency of

PCR as an exponential function. The geometric mean of selected housekeeping genes is used as a normalization factor, allowing eliminating inter-sample variations.

Lactate and glucose quantification

The concentrations of glucose and lactate concentrations in cell culture supernatants were determined using enzymatic assays (Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. Results are expressed in mmol/L or as a rate (mmol/L/24 h) of consumption or production (concentration values divided by the number of days of culture), with positive and negative values corresponding to consumption and production, respectively.

Analysis of lactic acid metabolism

In order to monitor extracellular lactate metabolism, monocytes were differentiated for 5 days with 50 ng/mL GM-CSF plus 10 mM ^{13}C -lactate sodium (Sigma-Aldrich), pH=6.5. ^{13}C -containing metabolites present in day-5 cell culture supernatants and cell extracts were analyzed by NMR spectroscopy and liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-MS), respectively.

Freeze-dried supernatants were lyophilized and dissolved in 500 μL maleate-EDTA buffer (12.5 mM EDTA, 250 mM maleate, pH=7) and 50 μL heavy water (D_2O ; Sigma-Aldrich). After centrifugation (7,500 $\times$ g, 3 min, 15°C), samples were transferred into a 5-mm tube (Z107373; Bruker Biospin, Alexandria, NSW, Australia) before analysis with a NMR spectrometer Advance 700 Mz (Bruker Biospin). NMR analyzes were performed at 298 K (25°C) without tube spinning, using a proton-decoupled carbon pulse program (zgig) with 90° pulses (10 μs , 50 W). Acquisition parameters were: decoupling sequence waltz16, 0.9 s acquisition time, 65 k size of FID, and a relaxation delay (D1) of 1.2 s. 12,500 scans were done, representing about 10 h analysis per sample. ^{13}C -quantitation was performed by peak integration with TopSpin 3.5 pl 7 using maleate (125 μmol per sample) as an internal standard.

Frozen cell pellets were resuspended in cold methanol (MeOH) and vortexed for 1 min. Samples were extracted with MeOH:acetonitrile: H_2O (2:2:1; v:v) and the mixture was then vortexed for 30 sec and centrifuged (8,000 $\times$ g, 10 min, 4°C). The resulting supernatant was evaporated to dryness using a miVac duo concentrator (Genevac Ltd, Ipswich, UK). The dry extract was reconstituted with 200 μL of a solution of 2% aqueous MeOH (initial conditions of the chromatographic elution gradient) and subjected to a second centrifugation (8,000 $\times$ g, 10 min, 4°C) prior to mass spectrometry analysis. The analytical system was based on a reverse phase ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) (Dionex™ UltiMate 3000; Thermo Scientific, Waltham, MA) coupled to a high-resolution mass spectrometer (LC-MS) (Q Exactive™; Thermo Scientific). LC-MS analysis was

performed according to a recently validated method (33). Results are expressed as a percentage of redistribution of ^{13}C into metabolites present in the day-5 cell culture supernatants (RMN) or isotopic enrichment in each molecule taken individually in day-5 cell lysates (LC-MS).

Measurements of oxygen consumption rate

The XF96 extracellular flux analyzer (Seahorse analyzer; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was used to determine the bioenergetic profile of macrophages. Day-5 cells were seeded (50×10^3 cells/well) in XF96 plates and allowed to recover for 24 h. Cells were then incubated in bicarbonate-free DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 11 mM glucose, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate in a CO_2 -free incubator for 1 h. The oxygen consumption rate (OCR) was recorded to assess the mitochondrial respiratory activity and glycolytic activity. After measurements under basal conditions, cells were treated sequentially with 2 $\mu\text{g/mL}$ oligomycin and 3 μM carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP; Sigma-Aldrich). Non mitochondrial respiration (OCR value after addition of 1 $\mu\text{g/mL}$ antimycin A) was subtracted from all OCR measurements. ATP-linked respiration was estimated from the difference between the basal and the oligomycin-inhibited respiration, proton-leak respiration is obtained by subtracting non-mitochondrial respiration from the oligomycin rate and the maximal respiratory capacity was the rate in the presence of the uncoupler FCCP. Three independent replicates of each measurement were generated, and results were normalized according to cell concentrations.

Co-culture assay

In order to evaluate the impact of tumor cell-derived LA on the phenotype of macrophages, monocytes were co-cultured with the primary tumor cells CASC170, CKC0829 and CKT0151 cells isolated from patients with primary ovarian cancer peritoneal carcinosis (Biological resource center, University Hospital of Rennes, Rennes, France; agreement BB-0033-00056) and selected on their capacity to produce LA (Supplementary Fig. S1a). Monocytes were co-cultured with the tumor cells using 12-well Transwell units with 0.4 μm diameter pore size polycarbonate filters (Corning, New York, NY). Monocytes (1×10^6 cells/mL) were seeded in the lower compartment containing 50 ng/mL GM-CSF, in the absence or presence of CHC, and 2.5×10^4 tumor cells were added in the upper part of the Transwell. After 5 days, macrophages were analyzed by flow cytometry and by qPCR. In some experiments, macrophages were washed and counted (0.5×10^6 living cells/mL in fresh CM) before stimulation with 200 ng/mL LPS for cytokine quantification.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). The non-parametric Wilcoxon matched-pairs test was used to compare means. For the comparison of antigen expression time course, two-way analysis of variance (ANOVA) with a posthoc Bonferroni's multiple comparison test was used. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Acknowledgments

The authors acknowledge Muriel Gervois (University Hospital of Rennes, Rennes, France), Catherine Guillet and Jérôme Cayon (PACeM facility; University of Angers) for expert technical assistance. This work was realized in the context of the LabEX IGO program (National Research Agency; ANR-11-LABX-0016-01) and (ii) of SIRIC ILIAD program (National Cancer Institute, Ministry of Health and the Institute for Health and Medical Research; INCa-DGOS-Inserm_12558).

References

1. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* **2016**;17:9-17
2. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **2012**;122:787-95
3. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **2014**;40:274-88
4. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **2008**;8:958-69
5. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **2002**;23:549-55
6. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**;14:399-416
7. Mitsi E, Kamng'ona R, Rylance J, Solorzano C, Jesus Reine J, Mwandumba HC, *et al.* Human alveolar macrophages predominately express combined classical M1 and M2 surface markers in steady state. *Respir Res* **2018**;19:66
8. Moganti K, Li F, Schmuttermayr C, Riemann S, Kluter H, Gratchev A, *et al.* Hyperglycemia induces mixed M1/M2 cytokine profile in primary human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* **2017**;222:952-9
9. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, *et al.* A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* **2006**;107:2112-22
10. Reinartz S, Schumann T, Finkernagel F, Wortmann A, Jansen JM, Meissner W, *et al.* Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int J Cancer* **2014**;134:32-42
11. Muller S, Kohanbash G, Liu SJ, Alvarado B, Carrera D, Bhaduri A, *et al.* Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol* **2017**;18:234
12. Azizi E, Carr AJ, Plitas G, Cornish AE, Konopacki C, Prabhakaran S, *et al.* Single-Cell Map of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. *Cell* **2018**;174:1293-308 e36
13. Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, Silina K, Schulz D, Bacac M, *et al.* An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell* **2017**;169:736-49 e18
14. Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, Ghassabeh GH, Scotton C, Locati M, *et al.* Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol* **2005**;174:6561; author reply -2
15. Jeannin P, Paolini L, Adam C, Delneste Y. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *FEBS J* **2018**;285:680-99
16. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **2004**;25:677-86
17. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* **2015**;21:938-45
18. Song L, Asgharzadeh S, Salo J, Engell K, Wu HW, Sposto R, *et al.* Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* **2009**;119:1524-36
19. Smith MP, Sanchez-Laorden B, O'Brien K, Brunton H, Ferguson J, Young H, *et al.* The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNFalpha. *Cancer Discov* **2014**;4:1214-29
20. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**;324:1029-33
21. Sun S, Li H, Chen J, Qian Q. Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology (Bethesda)* **2017**;32:453-63
22. Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res* **2011**;71:6921-5

23. Hu X, Chao M, Wu H. Central role of lactate and proton in cancer cell resistance to glucose deprivation and its clinical translation. *Signal Transduct Target Ther* **2017**;2:16047
24. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreessen R, *et al.* Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* **2006**;107:2013-21
25. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, *et al.* Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* **2007**;109:3812-9
26. Angelin A, Gil-de-Gomez L, Dahiya S, Jiao J, Guo L, Levine MH, *et al.* Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments. *Cell Metab* **2017**;25:1282-93 e7
27. Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MM, Prado-Garcia H, Sanchez-Garcia FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front Immunol* **2016**;7:52
28. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **2014**;513:559-63
29. Carmona-Fontaine C, Deforet M, Akkari L, Thompson CB, Joyce JA, Xavier JB. Metabolic origins of spatial organization in the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**;114:2934-9
30. Laoui D, Van Overmeire E, Di Conza G, Aldeni C, Keirsse J, Morias Y, *et al.* Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer Res* **2014**;74:24-30
31. Hobson-Gutierrez SA, Carmona-Fontaine C. The metabolic axis of macrophage and immune cell polarization. *Dis Model Mech* **2018**;11
32. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **2007**;110:4319-30
33. Preisser L, Miot C, Le Guillou-Guillemette H, Beaumont E, Foucher ED, Garo E, *et al.* IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* **2014**;60:1879-90
34. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **2002**;3:RESEARCH0034
35. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, *et al.* LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab* **2016**;24:657-71
36. Polanski R, Hodgkinson CL, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, *et al.* Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **2014**;20:926-37
37. Izquierdo E, Cuevas VD, Fernandez-Arroyo S, Riera-Borrull M, Orta-Zavalza E, Joven J, *et al.* Reshaping of Human Macrophage Polarization through Modulation of Glucose Catabolic Pathways. *J Immunol* **2015**;195:2442-51
38. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* **2016**;35:5931-41
39. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, *et al.* Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol* **2012**;188:5752-65
40. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2017**;17:559-72
41. Martinez D, Vermeulen M, von Euw E, Sabatte J, Maggini J, Ceballos A, *et al.* Extracellular acidosis triggers the maturation of human dendritic cells and the production of IL-12. *J Immunol* **2007**;179:1950-9
42. Rajamaki K, Nordstrom T, Nurmi K, Akerman KE, Kovanen PT, Oorni K, *et al.* Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem* **2013**;288:13410-9
43. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* **2008**;222:155-61

44. Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, *et al.* Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* **2013**;121:e57-69
45. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* **2000**;1:510-4
46. Gliniak BC, Rohrschneider LR. Expression of the M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of GM-CSF or multi-CSF. *Cell* **1990**;63:1073-83
47. Brocheriou I, Maouche S, Durand H, Braunersreuther V, Le Naour G, Gratchev A, *et al.* Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2011**;214:316-24
48. Conway JG, McDonald B, Parham J, Keith B, Rusnak DW, Shaw E, *et al.* Inhibition of colony-stimulating-factor-1 signaling in vivo with the orally bioavailable cFMS kinase inhibitor GW2580. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102:16078-83
49. Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Garo E, Ifrah N, Guardiola P, *et al.* IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFNgamma. *PLoS One* **2013**;8:e56045
50. Lee DC, Sohn HA, Park ZY, Oh S, Kang YK, Lee KM, *et al.* A lactate-induced response to hypoxia. *Cell* **2015**;161:595-609
51. De Saedeleer CJ, Copetti T, Porporato PE, Verrax J, Feron O, Sonveaux P. Lactate activates HIF-1 in oxidative but not in Warburg-phenotype human tumor cells. *PLoS One* **2012**;7:e46571
52. Lee K, Zhang H, Qian DZ, Rey S, Liu JO, Semenza GL. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**;106:17910-5
53. Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, *et al.* Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* **2010**;120:2699-714
54. Lu H, Forbes RA, Verma A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* **2002**;277:23111-5
55. Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **1927**;8:519-30
56. Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer CJ, Vegrn F, Verrax J, Kennedy KM, *et al.* Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* **2012**;7:e33418
57. Wenes M, Shang M, Di Matteo M, Goveia J, Martin-Perez R, Serneels J, *et al.* Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis. *Cell Metab* **2016**;24:701-15
58. Chambers SK. Role of CSF-1 in progression of epithelial ovarian cancer. *Future Oncol* **2009**;5:1429-40
59. Ide H, Seligson DB, Memarzadeh S, Xin L, Horvath S, Dubey P, *et al.* Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**;99:14404-9
60. Kacinski BM, Scata KA, Carter D, Yee LD, Sapi E, King BL, *et al.* FMS (CSF-1 receptor) and CSF-1 transcripts and protein are expressed by human breast carcinomas in vivo and in vitro. *Oncogene* **1991**;6:941-52
61. Hallett MA, Venmar KT, Fingleton B. Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13. *Cancer Res* **2012**;72:6338-43
62. Chen J, Yao Y, Gong C, Yu F, Su S, Liu B, *et al.* CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PTPN23. *Cancer Cell* **2011**;19:541-55
63. Su S, Liao J, Liu J, Huang D, He C, Chen F, *et al.* Blocking the recruitment of naive CD4(+) T cells reverses immunosuppression in breast cancer. *Cell Res* **2017**;27:461-82
64. Delneste Y, Charbonnier P, Herbault N, Magistrelli G, Caron G, Bonnefoy JY, *et al.* Interferon-gamma switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood* **2003**;101:143-50
65. Lou J, Low-Nam ST, Kerkvliet JG, Hoppe AD. Delivery of CSF-1R to the lumen of macropinosomes promotes its destruction in macrophages. *J Cell Sci* **2014**;127:5228-39
66. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**;101:4560-5

67. Garcia S, Hartkamp LM, Malvar-Fernandez B, van Es IE, Lin H, Wong J, *et al.* Colony-stimulating factor (CSF) 1 receptor blockade reduces inflammation in human and murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **2016**;18:75
68. Hamilton JA, Cook AD, Tak PP. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2016**;16:53-70
69. Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol* **2007**;178:7516-9
70. Casazza A, Di Conza G, Wenes M, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Mazzone M. Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene* **2014**;33:1743-54
71. Yan WL, Shen KY, Tien CY, Chen YA, Liu SJ. Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* **2017**;9:347-60
72. Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, Stanger BZ, *et al.* Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell* **2012**;21:822-35
73. Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D. Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer Cell* **2012**;21:836-47
74. Reggiani F, Labanca V, Mancuso P, Rabascio C, Talarico G, Orecchioni S, *et al.* Adipose Progenitor Cell Secretion of GM-CSF and MMP9 Promotes a Stromal and Immunological Microenvironment That Supports Breast Cancer Progression. *Cancer Res* **2017**;77:5169-82
75. Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thiruppathi M, Alharshaw K, Elshabrawy H, *et al.* Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy. *J Interferon Cytokine Res* **2015**;35:585-99
76. Achkova D, Maher J. Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer. *Biochem Soc Trans* **2016**;44:333-41

- b. Annexe2 : The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophage,

Jeannin P et al, revue publiée dans la revue FEBS Journal

Revue rédigée sur invitation et portant sur le rôle des CSF sur la génération des macrophages.

The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages

Pascale Jeannin^{1,2,3}, Léa Paolini^{1,3}, Clement Adam^{1,3} and Yves Delneste^{1,2,3}

¹ CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, France

² Laboratory of Immunology and Allergology, University Hospital of Angers, France

³ LabEx ImmunoGraftOnco, Angers, France

Keywords

cancer; CSF; differentiation; IL-34; macrophages; polarization

Correspondence

P. Jeannin, CHU d'Angers, IBS/IRIS, Inserm Unit 1232, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France

Fax: +33 244 688 594

Tel: +33 244 688 311

E-mail: pascale.jeannin@univ-angers.fr

(Received 20 September 2017, revised 3 November 2017, accepted 20 November 2017)

doi:10.1111/febs.14343

Macrophages have a central role in numerous physiological processes, such as immune defense, maintenance of tissue homeostasis, wound healing, and inflammation. Moreover, in numerous severe disorders, such as cancer or chronic inflammation, their functions can be profoundly affected. Macrophages continuously sense their environment and adapt their phenotypes and functions to the local requirements; this process is called plasticity. In addition to stress signals, metabolites, and direct cell-contact interactions with surrounding cells, numerous cytokines play a central role in controlling macrophage polarization. In this review, we will focus on three human macrophage differentiation factors: macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), IL-34, and granulocyte M-CSF. These CSFs allow human monocyte survival, promote their differentiation into macrophages, and control macrophage polarization as they give rise to cells with different phenotype and functions. Based on recent observations, the role of granulocyte CSF on macrophage polarization is also addressed. Finally, our current knowledge on the expression of these growth factors in tumor microenvironment and their impact on the generation and polarization of tumor-associated macrophages are summarized.

Functional plasticity, one of the most remarkable properties of macrophages

Macrophages are innate immune cells of the myeloid lineage that discriminates self from nonself (microbes) and altered or modified self (damaged cells), thanks to the expression of diverse innate receptors localized on their surface, in their cytosol or within intracellular compartments.

Macrophages are professional phagocytes that exhibit potent antimicrobial properties. Upon recognition by cell surface receptors (complement receptors, immunoglobulin receptors, and endocytic pattern recognition receptors), microbes are phagocytosed and, in most cases, destroyed into lysosomes. Antimicrobial molecules and enzymes, released upon activation by microbes, are part of their antimicrobial arsenal. In

Abbreviations

ADCC, antibody-dependent cell cytotoxicity; CCL, C-C motif chemokine ligand; CCR, C-C motif chemokine receptor; CD, cluster of differentiation; CSF, colony-stimulating factor; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; CXCL, C-X-C motif chemokine ligands; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN, interferon; IL, interleukin; mAb, monoclonal antibody; MAPK, mitogen-activated protein kinases; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MHC, major histocompatibility complex; PD1, programmed cell death 1; PDGF, platelet-derived growth factor; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinases; STAT, Signal transducer and activator of transcription; TAM, tumor-associated macrophage; TGF β , transforming growth factor β ; TLR, toll-like receptor; TNF α , tumor necrosis factor α ; Treg, regulatory T cells; VEGF, vascular endothelial growth factor.

addition to eliminating invading microbes, macrophages also actively participate to the elimination of dying cells, a process called efferocytosis. Contrasting with microbial moieties that activate macrophages, early apoptotic cells induce an immunoregulatory program that renders macrophages resistant to a subsequent activation. In contrast, late apoptotic cells release stimulatory danger signals. The uptake of late apoptotic cells by activated macrophages can induce an immune response against neoexpressed motifs that may, ultimately, lead to potentially harmful autoimmune responses [1,2]. Finally, macrophages express all the receptors for IgG [Fcγ receptors (FcγR)] and are capable of antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) [3].

Macrophages are also professional antigen-presenting cells. They express MHC-I and MHC-II molecules and control memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses. Contrasting with dendritic cells, they do not efficiently prime naive T cells as they (a) usually do not migrate in secondary lymphoid organs and (b) express lower levels of costimulatory molecules than mature dendritic cells. Macrophages produce a wide range of inflammatory [IL-1, tumor necrosis factor α (TNFα), IL-6], regulatory [IL-10, transforming growth factor β (TGFβ)], and T-cell-polarizing (IL-12, IL-1) cytokines as well as several chemokines and growth factors. They regulate the functions of other lymphoid (B lymphocytes, natural killer cells) and myeloid cells (such as neutrophils).

Tissues-resident macrophages (such as microglia in the brain, Kupffer cells in the liver, and osteoclasts in bones) are found in connective tissues and in every organ in the body. They are highly specialized, exhibiting physiological roles adapted to the biology of the hosting tissue [4–6]. Accordingly, tissue-resident macrophages exhibit specific transcriptional and metabolic programs which are specific to the tissue residence [7]. In addition to ontogeny cues, environmental signals contribute to shape tissue-resident macrophages [7]. In case of infection or tissue injury, when the challenge is too great to be handled solely by resident macrophages, monocytes, the circulating precursors of macrophages, are recruited and differentiate into macrophages. Cytokines, such as macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and CCL2, are the main chemoattractants involved in monocyte recruitment into tissues.

Resident and newly recruited macrophages, and more generally cells of the monocyte/macrophage lineage, act as patrollers that constantly sense their environment and adapt their metabolism, phenotypes, and functions to the signals received from the stroma, and more precisely, to the needs of the tissues. As a consequence, macrophages can adopt a huge variety of phenotypes and functions that reflect the diversity of signals that they integrate

permanently [8,9]. Macrophages can thus sometimes exhibit opposite properties (i.e., anti- versus pro-inflammatory, stimulatory versus regulatory) [10].

The term ‘Plasticity’ defines this capacity to adapt, in a dynamic manner, their phenotypes and functions to the nature of their environment. Sensing the environment is mediated via innate pattern recognition molecules and numerous cytokine receptors [7]. In addition, macrophages can also detect subtle modifications of the environment, such as variations in the concentrations of metabolites and of chemophysical parameters (such as extracellular pH and oxygen availability) [7].

As a consequence of their numerous physiological roles, the alteration and dysregulation of their functions may contribute to the pathogenesis of severe disorders, including chronic inflammatory diseases, autoimmunity, fibrosis, and cancers [11,12]. Currently, characterize the factors involved in the generation of macrophage subsets is crucial for deciphering their roles in physiological and pathological conditions and to propose innovative therapeutic strategies.

As mentioned above, a high diversity of macrophage phenotypes exist, rendering difficult their classification [8,9]. The initial classification into M1 and M2 cells, with M1 (also referred to as classical macrophages) and M2 (also called alternative macrophages) representing the extremes of a spectrum of polarization profiles, is still routinely used [10].

M1 cells are generated *in vitro* by culturing monocytes with interferon-γ (IFNγ), alone or in combination with microbial moieties (such as lipopolysaccharide). They are characterized by high levels of IL-12 and low levels of IL-10 (IL-12^{high} IL-10^{low}); they also produce pro-inflammatory cytokines (such as TNFα and IL-1β). M1 macrophages have potent antimicrobial and tumoricidal properties and favor the generation of type 1 T helper (Th1) lymphocytes. An excessive or unabated M1 polarization is commonly associated with chronic inflammation [11,13,14]. At the opposite, M2 cells, initially described as macrophages exposed to IL-4 or IL-13, exhibit an IL-10^{high} IL-12^{low} phenotype. IL-10, glucocorticoids, immune complexes, and ligands of the M-CSF receptor also induce different M2-type subsets with phenotypes distinct to those of IL-4-induced macrophages [11,13]. M2 cells are involved in physiological (i.e., immune defense, tissue remodeling, immune homeostasis) and pathological processes (i.e., tumor-associated immunosuppression, chronic inflammation, tissue destruction, and fibrosis) [10,11,14].

Macrophage polarization in cancer

In solid tumors, tumor-associated macrophages (TAMs) are the most abundant immunosuppressive leukocytes in

the tumor microenvironment and, in numerous solid tumors, their density is correlated with a poor prognosis [15,16]. In addition to immunoregulatory properties, TAMs favor angiogenesis and promote tumor-cell progression and metastasis. In agreement with their immunosuppressive and protumor properties, in most advanced tumors, TAMs exhibit a M2-like profile [11,17–19].

The acquisition of a M2-like phenotype by TAMs and their density within tumors are driven by signals originating not only from tumor cells but also from infiltrating immune cells (such as innate lymphoid cells and T and B lymphocytes) and stromal cells [15,16,20]. In line with the 3E theory of tumor immunity (elimination, equilibrium, and escape), it is also suspected that the functional polarization of TAMs follows a dynamic process that parallels the one of the tumor. In nascent tumors, M1-like macrophages may participate to the early elimination phase (orchestrated by T cells and IFNs). Subsequently, the equilibrium and escape phases are characterized by a subversion of macrophages, leading to a protumor M2-like polarization [15].

Consistent with the classical view of M1/M2 polarization, in established human breast or pancreatic cancers, IL-4 and IL-13, that constitute a Th2 cell signature, favor alternative M2 activation of TAMs [19]. However, in most studies, signals originating from tumor cells (such as chemokines and TGF β), infiltrating B cells (immune complexes), and stromal cells (such as IL-1) induce the differentiation of monocytes into macrophages which phenotypes do not completely fit with those ascribed to canonical M1 or M2 cells [15]. These studies indicate that the diversity of signals furnished locally to differentiating myeloid cells induces a diversity of TAM subtypes, different to the conventional M1/M2 phenotypes. Complexity increases with coexistence, in the same tumor, of distinct populations of TAMs, with different phenotypes and functions, as a result of tumor cell heterogeneity [15]. As an example, a recent study has identified 17 distinct subtypes of TAM by mass cytometry in clear cell renal carcinoma [21]. Among the different factors that have been identified involved in TAM heterogeneity, one can mention the presence of different infiltrating immune cell subsets, the nature of the metabolites (such as lactic acid), and the levels of oxygen [22].

Human macrophage differentiation factors

In human, three cytokines, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), M-CSF, and IL-34, promote monocyte survival and differentiation into macrophages. Although originally defined as hematopoietic cell growth factors, the colony-

stimulating factors, GM-CSF and M-CSF, also act on monocytes (mature myeloid cells), giving rise to macrophages with distinct phenotypes. IL-34, a more recently identified cytokine, also switches monocytes into macrophages with a specific phenotype. We will also summarize data on the role of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in the control of myeloid cell differentiation into macrophages. This review focuses on the role of these growth factors on myeloid cell differentiation and on their expression and roles in the tumor microenvironment. Their expression, biological activities, and potential clinical applications in inflammatory and autoimmune diseases have been reviewed recently [23,24].

M-CSF (CSF-1)

The colony-stimulating factor 1 *csf-1* gene, located in chromosome 1 (1p13.3) in human, encodes a 554 amino acid protein with a molecular mass of 60 179 Da. The active form is a disulfide-linked homodimer, probably produced by proteolytic cleavage of a membrane-bound precursor. M-CSF (also called MCSF or CSF-1) controls the production, differentiation, and functions of macrophages. In contrast to other CSFs, M-CSF is constitutively and ubiquitously expressed by numerous tissues and cell types and is present at high concentration in the blood ($\sim 10 \text{ ng mL}^{-1}$) [23,24].

The M-CSF receptor (known as c-fms, CSF-1R or CD115) is a tyrosine kinase encoded by the proto-oncogene *c-fms*. Mainly expressed on the monocytic lineage, CD115 is also expressed on several other cell types such as endothelial cells, trophoblasts, neural progenitor cells, and epithelial cells [25]. The binding of M-CSF to CD115 induces the early activation of PI3K and Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), followed by the activation of the PI3K/Akt and MAPK pathways.

M-CSF promotes the survival, proliferation (in mice), and differentiation of myeloid cells, including monocytes, macrophages, and osteoclasts. CD115 is expressed on murine dendritic cells during their differentiation and regulates their expansion [26]. *Csf1^{op/op}* mice, which lack biologically active CSF-1 due to a spontaneous mutation, have a reduction in the numbers of M-CSF-dependent tissue macrophages, severe growth retardation, osteopetrosis (very dense bones), and deficiencies in numerous systems [25,27]. Notably, M-CSF deficiency severely impacts lactation, ovulation, and preimplantation; accordingly, *csf1^{op/op}* mice have impaired mammary development and reduced reproductive capacities.

Mice with a null mutation of the *csf1r* gene (*csf1r*^{-/-} mice) also exhibit a severe depletion in macrophage populations, confirming that CSF-1R/CD115 is the only receptor for M-CSF. These mice have an even more severe phenotype than *csf1^{op/op}* mice and exhibit poorer viability, supporting the existence of another CD115 ligand which has been subsequently identified as IL-34 [28,29]. Supporting an important role in tissue development, *csf1r*^{-/-} mice, as observed in *csf1^{op/op}* mice, have perturbations in tissues development (bone, pancreas, mammary gland) [29]. Finally, depletion studies demonstrate a central role of the M-CSF-CD115 axis in the maintenance of macrophage homeostasis in tissues [30]. In addition to its roles in their differentiation, M-CSF also controls functional properties of mature macrophages, such as phagocytosis and chemotaxis.

M-CSF-macrophages exhibit immunoregulatory and profibrotic properties and are closed to ovarian cancer TAM

M-CSF promotes human monocyte survival and differentiation into macrophages that exhibit immunoregulatory properties and express mediators involved in tissue repair and cell proliferation/survival.

The transcriptome of human macrophages generated in the presence of M-CSF (M-CSF-macrophages) has been compared to the ones of GM-CSF-macrophages [31] and of M-CSF-macrophages polarized into alternative (IL-4-induced) or conventional (IFN γ plus LPS-induced) macrophages [32]. These studies showed that M-CSF-macrophages exhibit a unique M2-like phenotype, different to the one of M2a-c macrophages. A recent study has also reported that differences between human M-CSF- and GM-CSF-macrophage properties can be extended to their metabolism [33]. Similar to conventional M2 (elicited by IL-4 or IL-13) and M2-like macrophages (i.e., M2b induced by IL-1 β and M2c induced by IL-10), M-CSF-macrophages produce elevated levels of IL-10 and low levels of IL-12. However, M-CSF-macrophages also express low levels of the costimulatory molecules CD80 and CD86 (in contrast to M2a-c macrophages) and of TNF α (in contrast to M2b) [34]. Distinct from M2a-c macrophages, they express high levels of the membrane macrophage markers CD14 and CD163 [14,34]. This unique M2-like phenotype has sometimes been referred to as M2d.

In line with their regulatory cytokine signature, M-CSF-macrophages express high levels of the immunoregulatory molecules immunoglobulin-like transcripts 2 (ILT2) and ILT3 and of indoleamine 2,

3-dioxygenase (IDO), an enzyme that degrades tryptophan, an amino acid essential for T-cell functions. We have shown that IDO was functional in human ovarian cancer TAM and in M-CSF-macrophages and that inhibiting IDO partly prevented the capacity of M-CSF-macrophages to inhibit T-cell activation [34]. However, contrasting with murine M2 cells, they do not express inducible nitric oxide synthase nor the regulatory enzyme arginase 1 (Arg1).

Finally, M-CSF induces the differentiation of monocytes into macrophages that exhibit most of the phenotypic and functional characteristics of TAMs isolated from human ovarian cancer [34,35].

As other M2-like cells, M-CSF-macrophages are usually not considered as pro-inflammatory cells. Upon stimulation, in addition to producing high levels of IL-10, they secrete limited levels of IL-6 and low or undetectable levels of TNF α [34,35]. However, this concept is more complicated than previously thought, especially regarding the expression of IL-1. IL-1 α and IL-1 β are two members of the IL-1 cytokine family that are pro-inflammatory and signal via the same receptors. Mature IL-1 β is a soluble molecule while, in contrast, IL-1 α functions both as a soluble and as a membrane-bound cytokine. In agreement with the fact that M2-like cells are not pro-inflammatory, M-CSF-macrophages do not produce detectable IL-1 β . However, they constitutively express functional membrane IL-1 α [35]. Human M-CSF-macrophages have also been reported to constitutively express a membrane-bound form of IL-18, another proinflammatory cytokine belonging to the IL-1 family [36]. IL-1 is a potent human Th17-inducing factor. In support, we have shown that human M-CSF-macrophages switch non-Th17-committed memory CD4⁺ T cells into conventional pro-inflammatory CCR4⁺ CCR6⁺ CD161⁺ IL-17-producing T-helper (Th17) cells through membrane IL-1 α [35]. Interestingly, ovarian ascites TAM also constitutively express membrane IL-1 α [35]. This observation may contribute to explain how M-CSF-macrophages and TAMs may participate in the smoldering cancer-associated inflammation which is required in different tumor-associated processes [15], such as recruitment of circulating immune cells and neovascularization.

M-CSF also (a) upregulates the expression by differentiating monocytes of CCL2 and CCL4, two chemokines involved in the recruitment of monocytes and (b) induces the expression of the chemokine receptors, CCR1 and CCR5, which are involved in the recruitment of monocytes in inflammatory/injured sites [37]. In addition, M-CSF-macrophages express numerous growth factors (PDGF, TGF β , and galectin-3)

that trigger type I collagen synthesis by stellate cells. These observations supported a role of M-CSF-macrophages in tissue repair and in fibrosis [37]. These mediators have also been involved in tumor progression [38–40].

In conclusion, M-CSF-macrophages express high levels of the macrophage markers CD14 and CD163 (CD14^{high} CD163^{high}), produce high levels of the immunoregulatory cytokine IL-10 and low levels of the immunostimulatory cytokine IL-12 (IL-10^{high} IL-12^{low}), express low levels of the costimulatory cytokine CD86 (CD86^{low}), and express functional IDO. Interestingly, they exhibit a phenotype and functional properties (especially immunoregulatory and protumoral) similar to ovarian ascites TAM.

M-CSF in tissue homeostasis and repair

M-CSF is involved in tissue repair. It favors kidney and liver repair after acute injury [41,42]. Moreover, the administration of M-CSF limits acute graft-versus-host disease [43]. In support, it is well known that macrophages have a central role in tissue repair and regeneration [44]. As an example, their presence is required in all stages of skin repair [45]. Supporting these *in vivo* observations, M-CSF is constitutively expressed in numerous tissues and gives rise *in vitro* to immunoregulatory macrophages which promote wound healing/tissue repair. Human M-CSF-macrophages produce angiogenic factors (such as vascular endothelial growth factor), numerous mediators required for wound healing and tissue repairs, such as matrix metalloproteases and TGF β , and promote collagen synthesis, a process required in wound healing [34,37].

M-CSF in chronic inflammatory contexts

The expression of M-CSF can be drastically elevated in numerous chronic inflammatory contexts [24]. M-CSF production is increased in patients suffering from rheumatoid arthritis and hepatic fibrosis. We have shown that M-CSF and IL-34 are overexpressed in the liver of chronically hepatitis C virus-infected patients and patients with high fibrosis stages exhibit higher serum levels of M-CSF than those with lower fibrosis stages [37]. Interestingly, neutralizing CD115 can reduce the signs of inflammation, suggesting that targeting the M-CSF/CD115 axis could constitute a therapeutic strategy in chronic inflammatory disorders. Clinical trials based on targeting this axis are in progress, however, with limited results so far [24].

Thus, according to the context, M-CSF-macrophages may limit or exacerbate inflammation. Although they

contribute to maintain tissue homeostasis in normal situations, an unabated activation of M-CSF-macrophages may have profound deleterious consequences. In support, it has been shown that a concomitant crosslinking of Fc γ R together with a stimulation with a toll-like receptor (TLR) agonist, confer pro-inflammatory properties to human M-CSF-macrophages [46].

M-CSF expression in cancers and evidences for a role of CD115 signaling in tumorigenesis

Elevated production of M-CSF and expression of CD115 have been associated with poor prognosis in numerous cancers, such as hepatocellular carcinoma, breast cancer, ovarian cancer, renal cell carcinoma, and Hodgkin lymphoma [47–51]. High levels of serum M-CSF are associated with a poor outcome in ovarian cancers and are frequently elevated in metastatic breast cancers [47]. In contrast, normal ovarian and breast tissues do not express CD115, and express low levels of M-CSF [47]. In support, *csf1^{op/op}* mice exhibit significantly reduced metastasis in mammary tumors and delayed tumor progression in different tumor models [52–54]. Similarly, transgenic M-CSF overexpression accelerates disease progression and enhances macrophage infiltration into primary tumors [52].

More precisely, some tumor epithelial cells, such as most of the primary and metastatic tumor cells in ovarian cancers and invasive breast tumor cells, constitutively produce M-CSF [47]. CD115 expression has been detected on some epithelial cancer cells (such as breast cancer cells), while being undetectable on normal epithelial cells. The M-CSF/CD115 autocrine signaling confers a more invasive and metastatic phenotype to some CD115-expressing epithelial cancer cells, including ovarian cancer cells [47,55,56]. Consequently, in the tumor microenvironment, M-CSF has autocrine and paracrine roles thereby not only controlling the recruitment, accumulation, and polarization of macrophages into protumor TAM but also conferring a more invasive phenotype to CD115-expressing epithelial tumor cells.

CD115 appears as an ideal therapeutic target in cancer

Based on the above observations, the M-CSF/CD115 axis has emerged as an attractive target in the treatment of several cancers to prevent TAM recruitment and polarization. The antitumor impact of neutralizing the M-CSF/CD115 axis has been reported in numerous preclinical models of tumor development, using either chemical compounds that specifically inhibit the

tyrosine kinase activity of CD115 or neutralizing anti-CD115 or anti-M-CSF monoclonal antibodies (mAbs). These molecules induce a strong reduction in the number of infiltrating macrophages in mice models of tumor development [57]. As an example, blocking CD115 with the neutralizing mAb RG1755 reduces the density of TAM and increases the recruitment of CD8⁺ T cells [58]. In an immune-competent model of ovarian cancer, the inhibition of CD115 with the specific kinase inhibitor GW2580 reduces tumor infiltration by TAM and ascites volume and normalizes peritoneal vasculature [59]. BLZ945, an orally active and specific inhibitor of the kinase activity of CD115, attenuates the turnover of TAM, enhances infiltration by CD8⁺ T cells, and delays cervical and mammary tumor growth [60]. In a preclinical model of glioblastoma, this brain-penetrant inhibitor does not deplete TAM in treated mice but re-educates them into M1-type cells via the induction of IFN γ and GM-CSF secretion by glioma cells [61].

The therapeutic benefit of targeting the M-CSF/CD115 axis has also been validated in combined approaches. In preclinical models of tumor development, blocking CD115 signaling enhances the efficacy of the standard therapies (i.e., radiotherapy and chemotherapy) and of immunotherapies. In two different intracranial xenograft models of glioblastoma (using human cancer cells), PLX3397, a selective inhibitor of the tyrosine kinase activity of CD115, potentiates the therapeutic impact of ionizing radiations by preventing the recruitment of myeloid cells induced by radiation [62]. In a murine model of BRAF-driven melanoma, the depletion of TAM induced by PLX3397 increases the efficacy of adoptive cell transfer and of the oncogenic BRAF inhibitor vemurafenib [63,64]. In a mouse model of gemcitabine-resistant pancreatic ductal adenocarcinoma, the inhibition of monocyte/macrophage trafficking by GW2580 restores the sensitivity of tumor cells to gemcitabine [65]. Inhibiting CD115 signaling reverses macrophage-mediated resistance to androgen blockade therapy in a murine model of prostate cancer [66]. In mammary tumor-bearing mice, CD115 receptor antagonists enhance the efficacy of paclitaxel [67]. Interestingly, CD115 blockade also results in an upregulation of the expression of the regulatory (checkpoint inhibitors) molecules PD1 and CTLA-4 and combining PD1 and CTLA-4 antagonists with CD115 inhibitors potentiates tumor regression [68].

Currently, tyrosine kinase inhibitors and anti-M-CSF or anti-CD115 mAbs are evaluated in numerous clinical trials, either as monotherapy or in combination with other therapies, in the treatment of multiple

malignancies including breast carcinoma, leukemia, and glioblastoma [69]. To date, early clinical data report good tolerability of these compounds. Nevertheless, the efficacy in monotherapy appears limited, except in diffuse-type giant cell tumor (pigmented villonodular synovitis) [58,69,70].

Collectively, these studies demonstrate that reprogramming M-CSF-macrophages can potentiate the efficacy of conventional therapies and may render refractory cancers responsive to conventional and innovative therapies.

IL-34: an expression and involvement in cancer that remain to be explored

IL-34 has been identified as an alternative ligand for CD115 [28]. In human, the *il34* gene, located in chromosome 16 (16q22.1), encodes a 224 amino acid protein with a molecular mass of 27 482 Da. The active form is a disulfide-linked homodimer. IL-34 and M-CSF signal via the same receptor (CSF-1R, c-fms, or CD115) [28]. Although having very little homology with M-CSF, IL-34 binds CD115 with a higher affinity than M-CSF and induces a stronger phosphorylation of CD115 and of downstream signaling molecules [71].

In addition, IL-34, but not M-CSF, binds to two other receptors, PTP ζ and syndecan-1 (CD138). PTP ζ is a chondroitin sulfate proteoglycan which expression is restricted to the brain (neural progenitors and glial cells) and the kidney; its engagement by IL-34 induces the phosphorylation of the downstream effectors focal adhesion kinase and paxillin. CD138 has a broad distribution, is expressed in many cancers, and acts as a coreceptor for different growth factors. The binding of IL-34 to CD138 modulates the activation of CD115 and appears involved on the regulation of myeloid cell migration [72].

Physiological roles of IL-34: differentiation and survival of microglia and Langerhans cells

As for M-CSF, IL-34 mediates *in vitro* monocyte survival and differentiation into macrophages and promotes the proliferation of murine macrophages [28]. In contrast to M-CSF, IL-34 has a restricted pattern of expression [73], suggesting that their expressions are regulated by different epigenetic programs. Moreover, compared to M-CSF, IL-34 seems to be required for the generation of a restricted set of tissue-specific macrophages. In normal conditions, IL-34 is constitutively and predominantly produced in the epidermis and in the brain and is involved in the survival and differentiation of microglia and Langerhans cells; two

types of phagocytes present in the brain and in the skin, respectively. IL-34-deficient mice have fewer microglia and lack Langerhans cells [73,74]. The expression of IL-34 by some Foxp3⁺ human regulatory T cells (Treg) has also been reported, suggesting a role for IL-34 in immune tolerance [75,76].

IL-34 in inflammatory disorders

In contrast to M-CSF, IL-34 is undetectable in the serum of healthy subjects [23]. An overexpression of IL-34 has been reported in some severe diseases associated with chronic inflammation, such as viral infections [37,77], inflammatory bowel diseases [78], rheumatoid arthritis [76,79], systemic lupus erythematosus [80], and Sjogren's syndrome [81]. In contrast, one study has reported a decrease in IL-34 expression in patients chronically infected by hepatitis B virus [82].

IL-34 induces the differentiation of human monocytes into macrophages that are similar to M-CSF-macrophages

IL-34 and M-CSF, which share a common receptors, induce the differentiation of human monocytes into macrophages which exhibit very similar phenotypes [35,37,83]. These macrophages have an immunoregulatory phenotype (IL-10^{high} IL-12^{low}) and express low levels of MHC-II and of the costimulatory molecules CD80 and CD86 [34,35,83,84]. As M-CSF-macrophages, IL-34-macrophages exhibit low T-cell costimulatory properties and dampen the activity of effector T cells [83]. In addition, similar to M-CSF-macrophages, IL-34-macrophages constitutively express membrane IL-1 α and switch human memory T cells into Th17 cells in a cell contact-dependent manner [35]. IL-34-macrophages also constitutively express mediators involved in wound healing and tissue repair (such as PDGF, TGF β , and galectin-3) [37].

IL-34 expression in tumors

Recent studies suggested the involvement of IL-34 in tumorigenesis. An integrative genomic analysis has evidenced the expression of IL-34 in various types of cancers and, in some cases, an association between IL-34 transcription and cancer prognosis [41]. The downregulation of expression of miR-28-5p, a miRNA targeting IL-34 transcription, in patients with hepatocellular carcinoma was associated with high levels of IL-34, high number of TAM, and a poor prognosis [85]. Other authors have observed that high levels of IL-34 were correlated with poor prognosis in primary

human lung cancers [86]. They also reported that chemoresistant A549 and H1299 cell lines, but not their chemosensitive counterparts, produced IL-34. Then, in a humanized murine model of tumor development, they observed that targeting IL-34 in chemoresistant tumors inhibited tumor growth when associated with chemotherapy [86]. Finally, the authors proposed the involvement of an unexpected autocrine effect of IL-34 in chemoresistant cells through an activation of the Akt signaling pathway [86].

Collectively, as observed for M-CSF, IL-34 induces M2-like macrophages with protumoral and immunoregulatory properties. IL-34 may also be involved in the induction/maintenance of immune tolerance. It may also signal directly on some tumor cells. Nevertheless, analysis of IL-34 expression and precise roles in cancers remain to be determined in more detail. In our studies, we failed in detecting IL-34 expression in numerous human tumors by immunohistochemistry (S. Blanchard & P. Jeannin, unpublished data), whereas, as expected, M-CSF expression was detected in numerous cancer tissues.

GM-CSF: a M1-inducing factor associated to cell activation

The colony-stimulating factor 2 (*csf2*) gene, located in human chromosome 5 (5q31.1), encodes a 144 amino acid protein with a molecular mass of 16 295 Da. The active form is a disulfide-linked homodimer. GM-CSF (CSF-2) signals via a heterodimeric receptor composed of a low-affinity binding α chain (CSF2R α or CD116) and a signal-transducing β chain (CSF2R β or CD131), the latter being common to the IL-3, IL-5, and GM-CSF receptors. CD116 is expressed on numerous cell types, including endothelial cells, monocyte/macrophages, granulocytes, and lymphocytes. Engagement of CD116 activates STAT5 and the PI3K/Akt pathway [24].

GM-CSF has a critical role in hematopoiesis as it regulates the differentiation of hematopoietic stem cell/progenitor cells into dendritic cells, granulocytes, and macrophages. GM-CSF also regulates the expression of anti-apoptotic genes in myeloid cells and promotes macrophage survival [87].

In healthy subjects, GM-CSF is undetectable in the circulation. GM-CSF is produced in response to activation by immune (B and T lymphocytes, macrophages) and nonimmune cells (endothelial cells, fibroblasts) [23,24].

In mice, GM-CSF is produced mostly by lung epithelial cells and by innate lymphoid cells present in the intestine upon recognition of luminal

microorganisms. GM-CSF thus plays a key role in the maintenance of lung and intestinal tissue macrophages [87]. Murine GM-CSF also promotes fetal monocyte differentiation into mature alveolar macrophages that are able to clear surfactant proteins [88]. The absence of functional GM-CSF or CD116 impairs lung and intestinal macrophage homeostasis and increases susceptibility to infection [89].

Role and expression of GM-CSF in chronic inflammation

GM-CSF is usually considered as a pro-inflammatory cytokine [90]. The mRNA-encoding GM-CSF is over-expressed in different inflammatory disorders. However, only few studies reported an increase in its serum concentration, suggesting a local action, at sites of inflammation [91]. Accordingly, GM-CSF is detectable in peripheral fluids, such as synovial fluids of patients with arthritis and cerebrospinal fluids of patients with multiple sclerosis [91]. In rheumatoid arthritis, synovial CD4⁺ T-cell-derived GM-CSF triggers the differentiation of inflammatory dendritic cells [92].

The administration of GM-CSF exacerbates collagen-induced arthritis. In contrast, GM-CSF-deficient (*csf2*^{-/-}) mice are protected [93–95] and the neutralization of GM-CSF suppresses inflammation and protects cartilage in an acute animal model of arthritis (streptococcal cell wall-induced arthritis) [96]. Moreover, *csf2*^{-/-} mice are protected against experimental autoimmune encephalomyelitis, a murine model of multiple sclerosis [23,24]. The pro-inflammatory properties of GM-CSF seem related to its ability to promote the differentiation of hematopoietic cells into granulocytes and macrophages, to sustain the recruitment of immature monocytes into injured tissues, and to switch human monocytes into pro-inflammatory macrophages.

Studies have underlined the pivotal role played by GM-CSF-derived T cells in chronic inflammatory and/or autoimmune disorders. Indeed, GM-CSF produced by activated T cells connects pathogenic T cells and the myeloid compartment. In mouse models of autoimmunity, the pathogenicity of IL-23-driven Th17 cells has been associated with their ability to produce GM-CSF [97]. In human, IL-12, rather than IL-23, promotes GM-CSF production by CD4⁺ T cells [98]. Based on these observations, clinical trials have been carried out in inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, asthma, or multiple sclerosis, to neutralize the GM-CSF/CD116 axis, especially using neutralizing mAbs [24,99].

Human GM-CSF-macrophages exhibit pro-inflammatory properties

GM-CSF switches human monocytes into pro-inflammatory macrophages, usually referred to as M1 cells (even in the absence of IFN γ). These macrophages exhibit T-cell costimulatory, antitumor, and microbicidal properties. In response to stimulation, human GM-CSF-macrophages produce high levels of the pro-Th1 cytokine IL-12 and of the pro-Th17 cytokine IL-23. They also produce numerous pro-inflammatory cytokines (such as IL-1 β , TNF α , and IL-6) and chemokines involved in the recruitment of neutrophils (such as CCL23, CXCL5, and CXCL8) and of monocytes. In contrast, they produce low/undetectable levels of IL-10 [31,34,100,101].

In addition, GM-CSF is critical for the *in vitro* generation of human and murine dendritic cells. IL-4 or IL-13 acts together with GM-CSF to switch human monocytes into monocyte-derived immature dendritic cells [102,103]. In mice, GM-CSF allows the survival and homeostasis of nonlymphoid tissue-resident dendritic cells whereas it is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells [104]. Moreover, the expression of CD116 on lung dendritic cells is required to induce CD8⁺ T-cell immunity *in vivo* [104]. These results have highlighted GM-CSF as a critical factor in designing cytotoxic T-cell (CTL)-based vaccines [105].

GM-CSF as an adjuvant in CTL-based vaccines

In addition to its role in hematopoiesis and inflammation, GM-CSF is also an immune stimulant that boosts immune cell functions in case of infections or cancers. In mice, GM-CSF enhances antitumor immune responses, at least partly through the recruitment and activation of murine dendritic cells [105]. Consequently, GM-CSF has been used as an adjuvant in antitumor vaccines in phase I clinical trials. Engineered GM-CSF-producing autologous cancer cells stimulated antitumor immunity in patients and this effect appeared mediated through the generation of a microenvironment that favors tumor antigen presentation [106–109].

Contrastingly, in clinical trials, the injection of high doses of GM-CSF induced immunosuppression, as evidenced by a decrease in CD8⁺ T-cell responses and increase in Treg cells [105]. Moreover, several *in vivo* studies have reported that GM-CSF can suppress autoimmune diseases, such as Crohn's disease, type I diabetes, and myasthenia gravis [90,110].

The dual pro-inflammatory versus immunoregulatory activities of GM-CSF may result from its

capacity, in the absence of additional stimuli, to maintain granulocytes and macrophages in a steady state and to favor the generation of immature tolerogenic dendritic cells. In support, human GM-CSF-macrophages and IL-4 plus GM-CSF-generated dendritic cells have to be efficiently stimulated (i.e., with TLR ligands or CD40 ligation) to produce pro-inflammatory cytokines and to undergo a maturation process, respectively. Stimuli present locally in lesions associated to some inflammatory disorders (such as immune complexes and type I IFNs) may efficiently activate GM-CSF-generated myeloid cells, thereby revealing the pro-inflammatory potential of GM-CSF.

Evidences for direct and indirect roles of GM-CSF in cancers

The expression of GM-CSF is upregulated in numerous human cancers (such as brain, colorectal, lung, head and neck, and bladder cancers) and, in most of these cancers, high levels of circulating or tumor levels of GM-CSF are correlated with poor prognosis [107]. Nevertheless, as for its immune properties (stimulatory versus regulatory), GM-CSF also exhibits dual roles on tumor progression, depending on the type of tumors.

In models of pancreatic cancers, different authors have reported that GM-CSF produced by tumors 'mask' them from the immune system by favoring the recruitment of immunosuppressive myeloid cells, thereby suppressing antigen-specific T cells and favoring neoplasia [111,112]. Neutralization of GM-CSF inhibits myeloid cell recruitment and prevents tumor development in a CD8⁺ T cell-dependent manner [111,112]. GM-CSF has also been shown to favor tumor progression and metastasis via immune-independent effects [107]. GM-CSF has been described as an autocrine or paracrine tumor-promoting factor in various cancers (bladder cancer, colorectal and lung cancers, glioblastoma). The mechanisms involved in these direct effects remain poorly defined. By promoting vascular endothelial cell proliferation and migration, GM-CSF may participate to angiogenesis [107]. Contrastingly, suggesting a potential autocrine antitumor activity of GM-CSF, it has been observed that colorectal cancer cells overexpressing GM-CSF and its receptors do not develop in immunocompetent mice [113].

G-CSF

In human, the colony-stimulating factor 3 (*csf3*) gene, located in chromosome 17 (17q21.1), encodes a 207 amino acid protein with a molecular mass of

22 293 Da. The active form is a monomer. G-CSF (CSF-3) signals via a homodimeric receptor (CSF-3R, G-CSFR or CD114) that signals via STAT3 and STAT5 and the Akt/MAPK pathways [23,24]. CD114 is mainly expressed on early myeloid progenitors and mature neutrophils. Nevertheless, it can also be expressed, although in a lower extent, on human monocytes [114], human B and T lymphocytes, and endothelial cells.

G-CSF, as GM-CSF, is synthesized by unstimulated normal brain neurons [115], but its production is induced in numerous cell types upon activation (i.e., bone marrow stroma cells, endothelial cells, macrophages, and fibroblasts). G-CSF is poorly detectable in the circulation, except in cases of infection or inflammation [23,24]. High levels of G-CSF are constitutively present in the colon [116].

G-CSF regulates granulopoiesis and mobilizes hematopoietic stem cells

G-CSF induces neutrophil mobilization from bone marrow to the periphery, controls neutrophil numbers (both at steady state and upon infections) and survival as well as neutrophil effector functions, such as phagocytosis, bactericidal activity, and ADCC [116]. Injection of G-CSF induces neutrophilia in healthy subjects and G-CSF is used therapeutically in patients to correct chemotherapy-induced neutropenia. G-CSF is also administered to mobilize and collect peripheral blood hematopoietic stem cells from healthy donors for allogeneic stem cell transplantation [23,24,116].

G-CSF induces tolerogenic human myeloid cells

Immunomodulatory and anti-inflammatory properties of G-CSF have been reported *in vitro* and *in vivo* [116]. *In vitro*, G-CSF decreases LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokines by human monocytes [114]. In combination with IL-4, G-CSF induces the differentiation of human monocytes into dendritic cells that induce naive T-cell anergy [117]. Serums from G-CSF-mobilized healthy donors contain high levels of IL-10 and switch monocytes into tolerogenic dendritic cells that generate inducible Treg (or Tr1) lymphocytes [118].

The administration of G-CSF has beneficial effects in the treatment of different inflammatory disorders. *In vivo*, G-CSF promotes the generation of tolerogenic dendritic cells [119] and of Treg cells [120]. An amelioration of symptoms has been reported in some patients with Crohn's disease receiving G-CSF [121]. In healthy

donors, G-CSF mobilizes a population of immunoregulatory CD34⁺ monocytes that inhibit alloreactive responses and induce Tr1 cells [122]. The fraction of CD34⁺ monocytes in blood inversely correlates with the incidence of acute graft-versus-host disease in humans [122]. In mice, G-CSF also mobilizes murine multipotent CD34⁺ progenitors which favor Treg cell expansion, thereby preventing spontaneous type I diabetes [123,124] and ameliorating lupus nephritis [125].

G-CSF expression in cancers

The expression and roles of G-CSF in solid tumors remain poorly documented. An expression of G-CSF has been reported in head and neck, pancreatic, and ovarian tumors [126–128]. As GM-CSF, G-CSF is synthesized by glioblastoma and contributes to tumor growth and to the establishment of a potent immunosuppression [115].

One study has reported that G-CSF and CD114 are highly expressed in human gastric and colon cancers and that G-CSF promotes carcinoma cell proliferation and migration [129]. The expression of CD114 on a subpopulation of melanoma tumor cells is associated with altered growth and resistance to treatment [130]. CD114-positive neuroblastoma cells are highly tumorigenic and chemoresistant [131]. Recently, CD114 has been reported as a potential marker for cancer stem cells in neural crest-derived tumors, suggesting that its expression may contribute to disease relapse and poor outcome [132].

In addition to a direct effect on CD114-expressing tumor cells, G-CSF may give rise to immunoregulatory macrophages in cancers. Several human breast cancer cell lines produce G-CSF and give rise to immunoregulatory M2-like macrophages [133]. In human triple-negative breast cancers, an elevated expression of G-CSF is associated with the presence of CD163⁺ macrophages and with poor survival [133]. Then, revealing the potential for G-CSF neutralization as a therapeutic approach in human cancers associated with an elevated expression of G-CSF, authors have shown that a treatment with anti-G-CSF Abs induces protective tumor immunity in mouse colon cancer by promoting NK-cell activation as well as inducing T-cell responses. Interestingly, the numbers of macrophages producing IL-10 were decreased while the ones of IL-12-producing macrophages were increased, suggesting a shift from a pro-tumorigenic (M2-like) to an antitumorigenic (M1-like) phenotype [134]. Based on these results, the impact of G-CSF on the expression of M1/M2 markers and on TAM recruitment and function has to be evaluated in different solid tumors.

G-CSF and inflammation

As neutrophils have a central role in acute and chronic inflammation, G-CSF, a potent neutrophil-mobilizing cytokine, is sometimes considered as a pro-inflammatory cytokine. In support, in some inflammatory diseases, such as arthritis, the endogenous expression or administration of G-CSF can have detrimental consequences [24]. In mice models of arthritis, administration versus neutralization of G-CSF have been associated with exacerbation versus amelioration, respectively [135,136], evidencing a dual role for G-CSF in inflammatory/stressed conditions, according to the models.

Limits of our knowledge on the role of CSFs/IL-34 in the biology of human macrophages

The roles of GM-CSF, M-CSF/IL-34, and, in a lower extend, G-CSF, on human macrophage polarization have been extensively studied *in vitro*. By allowing macrophages accumulation and survival, these factors contribute to maintain tissue homeostasis and host defense in physiological conditions. In pathological situations, such as chronic inflammation, fibrosis, or cancer, an unabated or inappropriate polarization of macrophages contributes to exacerbate tissue lesions and to favor chronicity. Macrophage-polarizing factors have thus emerged as therapeutic targets, especially in cancers associated with an accumulation of protumoral and immunosuppressive TAM. Nevertheless, taken into account data from the literature, we propose that at least four points have to be taken in mind when analyzing the biological roles of CSFs/IL-34 in TAM accumulation and function.

First, the presence of one of these factors is not synonymous of consumption by myeloid cells. As an example, the consumption of M-CSF and IL-34 by myeloid cells and TAM is tightly regulated [34]. Second, these factors may have synergistic or antagonistic effect on macrophage polarization. Thus, to have a complete picture of myeloid cell differentiation factors expressed in a given tumor microenvironment appears essential to predict their impact on TAM phenotypes. Third, some antitumor therapies profoundly affect the expression of these factors in the tumor microenvironment, suggesting that the efficacy of strategies targeting these CSFs may depend on the associated treatments. Finally, these CSFs have different effects on human and murine myeloid cells, rendering difficult to extrapolate to human results obtained in murine models.

M-CSF consumption by human myeloid cells is tightly regulated: example of IL-6

Numerous *in vitro* studies have shown that M-CSF expression is not systematically associated by its consumption by myeloid cells. The differentiation of human monocytes into dendritic cells induced by GM-CSF plus IL-4 is associated with a constitutive production of M-CSF that time-dependently accumulates in cell culture supernatants during the differentiation process [34,137,138]. Moreover, M-CSF consumption by differentiating myeloid cells is tightly regulated. As an example, IL-6 upregulates CD115 turnover and dramatically increases autocrine M-CSF consumption by differentiating cells [34,137,138], thereby switching monocyte differentiation from M1 to M2-like cells [34] and from dendritic cells to macrophages [137,138]. Leukemia inhibitory factor (LIF) also boosts M-CSF consumption by differentiating human monocytes [34]. Interestingly, both IL-6 and LIF signal via STAT3 and favor the generation of immunoregulatory myeloid cells [139,140]. STAT3 is one of the major regulators of macrophage polarization into M2 cells [141]. Interestingly, the constitutive activation of STAT3 in TAM [142] has been associated to the production of soluble molecules promoting tumor growth [143]. In contrast to M-CSF, IL-34 is not expressed by human myeloid cells and, consequently, has no autocrine role in their *in vitro* differentiation. In addition to molecules that modulate CD115 turnover, it has been shown that the expression of CD115 is also tightly regulated at the transcriptional level [144]. Moreover, the TNF α -converting enzyme (TACE or ADAM17) may also participate to the regulation of myeloid cell sensitivity to M-CSF via its capacity to cleave membrane CD115 [145].

Complex interplays between M-CSF, GM-CSF, and G-CSF

In vitro, M-CSF and GM-CSF reciprocally counteract their own effects on macrophage polarization. The addition of GM-CSF, together with M-CSF or IL-34 on monocytes, prevents their differentiation into M2-like cells [83]. A transcription profile analysis of human macrophages generated by exposing monocytes to varying doses of GM-CSF and M-CSF revealed that the expression of the M-CSF-induced genes was dose-dependently counteracted by the addition of GM-CSF and vice versa [146]. Supporting these observations, GM-CSF suppresses the expression of CD115 mRNA [147,148]. We have observed that the interplay between M-CSF and GM-CSF is more complex. The addition

of M-CSF and GM-CSF on monocytes upregulates the expression of some M2 markers (such as CD14, CD163) on the generated macrophages [146]. However, when monocytes are first primed with GM-CSF, prior addition of M-CSF and IL-6, M-CSF synergizes with GM-CSF in inducing a proinflammatory profile (P. Jeannin, L. Paolini & C. Adam, unpublished results).

Moreover, in addition to modulating their biological effects on myeloid cells, these factors may also modulate their production. One study has reported, in a murine model of breast cancer, that the neutralization of the M-CSF/CD115 axis promotes metastasis development through an increase in G-CSF production and neutrophil recruitment [149]. In support, tumor development in *csf1^{op/op}* mice results in a decrease in TAM infiltration, whereas neutrophil recruitment increases [53]. These observations evidence complex interactions, both *in vitro* and *in vivo*, between the CSFs involved in monocyte/macrophage survival and polarization.

Cancer therapies may upregulate M-CSF or IL-34

The dual effects of TAM accumulation on the efficacy of anticancer therapies have been recently reviewed in details [15,17,150]. Briefly, the presence of TAM has been reported as beneficial for the efficacy of some drugs that induce immunogenic cell death (such as doxorubicine), kill macrophages (such as trabectedin), or confer antitumoral properties to TAM (gemcitabine) [15,17,150]. Moreover, macrophages, and especially M2 cells, can participate to the killing of mAb-opsonized tumor cells by ADCC and/or phagocytosis. Consequently, and although they maintain an immunosuppressive microenvironment, infiltrating M2-polarized macrophages may participate to the therapeutic efficacy of antitumor mAbs [151–153].

On the contrary, chemotherapy and radiotherapy induce tissue damages that usually trigger the recruitment of immunosuppressive myeloid cells, which orchestrate a misdirected tissue-repair response, reduce the adaptive antitumor immune responses, and protect cancer stem cells from cytotoxicity [15]. Different studies have reported that anticancer therapies are associated with an upregulation of the expression of factors involved in monocyte recruitment and functional polarization into M2-like cells, such as M-CSF or IL-34. Exposure of murine mammary epithelial carcinoma cells to paclitaxel, cisplatin, or ionizing radiation upregulates IL-34 and M-CSF mRNA expression [67]. Paclitaxel and cisplatin also induce M-CSF mRNA expression by human breast cancer cell lines [67]. In a transgenic mouse model of mammary carcinogenesis,

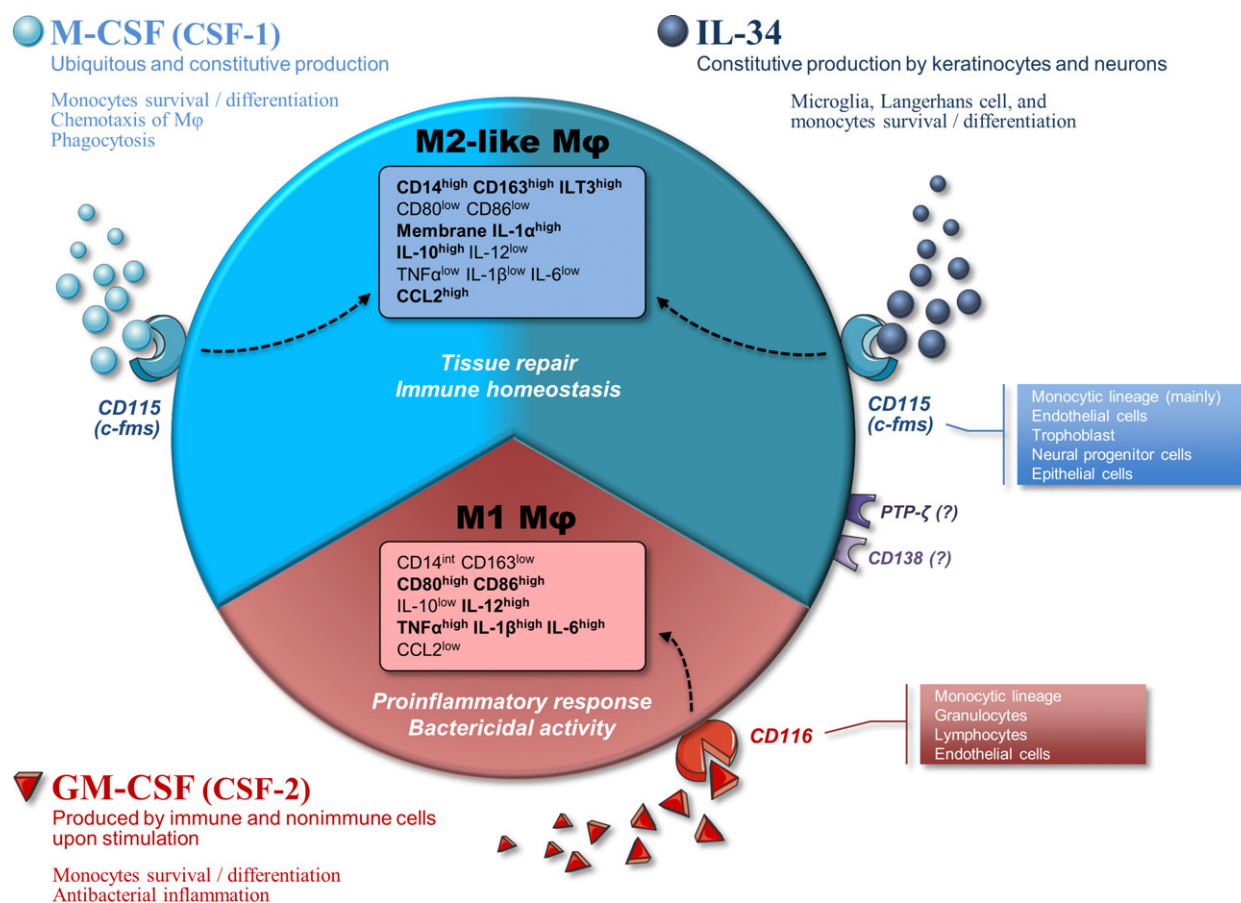


Fig. 1. GM-CSF, M-CSF, and IL-34 promote monocyte survival and polarization into different macrophages subsets. Schematic representation of the impact of the CD115 ligands (M-CSF and IL-34) and GM-CSF on the polarization of human macrophages into M2-like and M1 cells, respectively, in physiological situations.

blocking the recruitment of macrophages with CD115 antagonists enhanced the clinical efficacy of paclitaxel, as assessed by a CD8⁺ T-cell recruitment into the tumors and an improved survival [67]. Another study has reported that the doxorubicin-resistant A549 and cisplatin-resistant H1299 cell lines, but not their chemosensitive counterparts, secrete IL-34 and favor monocyte differentiation into M2-like cells [86]. In a murine model of prostate cancer, androgen blockade induces protumorigenic TAM infiltration through the induction of M-CSF expression by prostate cancer cells. Interestingly, CD115 inhibition improves the efficacy of androgen blockade by decreasing TAM recruitment [66]. In a mouse xenograft model of human glioblastoma, radiotherapy increases M-CSF and IL-34 mRNA expression by tumor cells and enhances myeloid cell recruitment; the combination of CD115 inhibition with radiotherapy blocks protumorigenic TAM differentiation and improves the efficacy of radiotherapy [62].

Different impacts of M-CSF and GM-CSF on human versus mouse macrophages

Notable differences exist between human and mice macrophages in terms of differentiation processes and acquisition of phenotypes and functions.

In mice, GM-CSF switches myeloid precursors into dendritic cells, whereas M-CSF gives rise to macrophages. Consequently, the *in vitro* combination of GM-CSF treatment plus inhibition of M-CSF redirects murine TAM into dendritic-like cells [154]. miRNA which downregulates CD115 expression favors murine monocyte-derived dendritic cell maturation [155]. Murine GM-CSF induces the generation of dendritic cells that spontaneously undergo a maturation process. Consequently, GM-CSF has been used as an adjuvant in animal models of therapeutic antitumor vaccines.

In human, both GM-CSF and M-CSF drive monocyte differentiation into macrophages, usually classified as M1 and M2 cells, respectively. IL-4/IL-13 plus

GM-CSF are required to induce *in vitro* the differentiation of human monocytes into tolerogenic immature human CD1a⁺ dendritic cells [102,103,156]. Additional factors, such as microbial moieties (i.e., lipopolysaccharide) or CD40 ligation, are required to induce human dendritic cell maturation [102,103]. Finally, addition of IL-4/IL-13 at day 1 or later to monocytes exposed to GM-CSF gives rise to M2-like macrophages (M2a) instead of dendritic cells. These results underline the importance of the presence of differentiation signals early during the differentiation process [10,157]. Finally, as dendritic cells, human M-CSF- and GM-CSF-macrophages have to be stimulated to reveal their phenotypes.

The phenotypes of murine and human macrophages also greatly differ. Prototypic mouse IL-4-induced M2 markers (i.e., Ym1 and Fizz1) have no human homologs; transglutaminase 2 (TGM2) appears as a unique conserved functional M2 marker in both human and mouse macrophages [32]. Moreover, numerous genes are differentially regulated in mouse and human macrophages. IL-4 and IL-13 upregulate the expression of TGF β and Arg1 in murine but not in human macrophages [37]. We have previously observed that IL-4/IL-13 upregulates CCL17 and CCL22 by murine macrophages and human GM-CSF-macrophages but not by human M-CSF-macrophages [34,37]. In addition, we observed that the impact of IL-4/IL-13-polarization on M-CSF- or GM-CSF-macrophages greatly differs; only M2 cells generated with IL-4/IL-13 plus M-CSF exhibit profibrotic properties [37]. Finally, mouse macrophages (including TAM) can proliferate [158,159]. Contrastingly, human monocytes and monocyte-derived macrophages appear as nondividing cells. Only one study has reported, in high grade and hormone receptor-negative tumors, the presence of PCNA⁺ cells that have been identified as proliferating TAM [159]. Nevertheless, it is admitted that, in human, the accumulation of TAM mainly results from peripheral blood monocyte recruitment rather than proliferation of resident myeloid cells [15].

Concluding remarks

The roles of GM-CSF, M-CSF/IL-34, and, in a lower extent, G-CSF, on human macrophage survival and function have been extensively studied *in vitro*. Schematically, these studies revealed that the CD115 ligands, IL-34 and M-CSF, favor the generation of M2-like cells involved in tissue repair and in maintenance of immune tolerance while GM-CSF favors the generation of antimicrobial and inflammatory M1 cells (Fig. 1). However, based on numerous observations, it

appears that the ways these factors control macrophage functions greatly vary with the context (physiological or pathological situations), especially regarding the nature of the environmental signals present during the differentiation process. Moreover, their effects on human and murine myeloid cells greatly differ.

Although these differentiation factors contribute to maintain tissue homeostasis and host defense in physiological conditions, they can also be associated to numerous pathological situations, such as chronic inflammation, fibrosis, and cancer. Moreover, an unabated/inappropriate macrophage polarization may contribute to tissue lesions. Macrophage-polarizing factors have thus emerged as therapeutic targets, especially in cancers due to the protumoral and immunosuppressive properties of TAM. Deeply analyzing their expression in different situations remains crucial to propose innovative therapeutic strategies to prevent the generation and/or re-educate macrophages.

Acknowledgments

The authors sincerely acknowledge actual and past members of the team for their valuable involvement in the research projects on macrophage biology. Studies are supported by institutional grants from Inserm and the University of Angers and by grants from the Ligue contre le Cancer and the Cancéropole Grand Ouest. The funders had no role in preparation of the manuscript and in decision to publish. Léa Paolini is supported by Angers Loire Métropole. Clément Adam is supported by a grant fellowship from the French Ministry of Research and Higher Education. This manuscript was prepared in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment of the future program (ANR-11-LABEX-0016-01).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Fond AM & Ravichandran KS (2016) Clearance of dying cells by phagocytes: mechanisms and implications for disease pathogenesis. *Adv Exp Med Biol* **930**, 25–49.
- 2 Arandjelovic S & Ravichandran KS (2015) Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol* **16**, 907–917.
- 3 Guillemins M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H & Lambrecht BN (2014) The function of Fc γ

- receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol* **14**, 94–108.
- 4 Schlitzer A & Schultze JL (2017) Tissue-resident macrophages – how to humanize our knowledge. *Immunol Cell Biol* **95**, 173–177.
 - 5 Epelman S, Lavine KJ & Randolph GJ (2014) Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**, 21–35.
 - 6 Perdiguero EG & Geissmann F (2016) The development and maintenance of resident macrophages. *Nat Immunol* **17**, 2–8.
 - 7 Okabe Y & Medzhitov R (2016) Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* **17**, 9–17.
 - 8 Mosser DM & Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958–969.
 - 9 Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L *et al.* (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* **40**, 274–288.
 - 10 Sica A & Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **122**, 787–795.
 - 11 Biswas SK & Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889–896.
 - 12 Chawla A, Nguyen KD & Goh YP (2011) Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 738–749.
 - 13 Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P & Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549–555.
 - 14 Martinez FO, Sica A, Mantovani A & Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* **13**, 453–461.
 - 15 Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L & Allavena P (2017) Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 399–416.
 - 16 Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, Nair VS, Xu Y, Khuong A, Hoang CD *et al.* (2015) The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* **21**, 938–945.
 - 17 Noy R & Pollard JW (2014) Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49–61.
 - 18 Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ & Natoli G (2015) Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol* **36**, 229–239.
 - 19 Williams CB, Yeh ES & Soloff AC (2016) Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer* **2**, 15025; <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.25>
 - 20 Murray PJ (2017) Macrophage polarization. *Annu Rev Physiol* **79**, 541–566.
 - 21 Chevrier S, Levine JH, Zanutelli VRT, Silina K, Schulz D, Bacac M, Ries CH, Ailles L, Jewett MAS, Moch H *et al.* (2017) An immune atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cell* **169**, 736–749.e718.
 - 22 Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM *et al.* (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* **513**, 559–563.
 - 23 Hamilton JA (2008) Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 533–544.
 - 24 Hamilton JA, Cook AD & Tak PP (2016) Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 53–70.
 - 25 Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V & Stanley ER (2002) Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**, 111–120.
 - 26 MacDonald KP, Rowe V, Bofinger HM, Thomas R, Sasmono T, Hume DA & Hill GR (2005) The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J Immunol* **175**, 1399–1405.
 - 27 Erlich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K & Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One* **6**, e26317.
 - 28 Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, Halenbeck R, Wu G, Zhou A, Behrens D *et al.* (2008) Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* **320**, 807–811.
 - 29 Chitu V & Stanley ER (2017) Regulation of embryonic and postnatal development by the CSF-1 receptor. *Curr Top Dev Biol* **123**, 229–275.
 - 30 Sauter KA, Pridans C, Sehgal A, Tsai YT, Bradford BM, Raza S, Moffat L, Gow DJ, Beard PM, Mabbott NA *et al.* (2014) Pleiotropic effects of extended blockade of CSF1R signaling in adult mice. *J Leukoc Biol* **96**, 265–274.
 - 31 Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, Scholz GM, Chang MW, Beckman SK, Cook AD & Hamilton JA (2012) Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol* **188**, 5752–5765.
 - 32 Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A,

- Ho LP *et al.* (2013) Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* **121**, e57–e69.
- 33 Izquierdo E, Cuevas VD, Fernandez-Arroyo S, Riera-Borrull M, Orta-Zavalza E, Joven J, Rial E, Corbi AL & Escribese MM (2015) Reshaping of human macrophage polarization through modulation of glucose catabolic pathways. *J Immunol* **195**, 2442–2451.
 - 34 Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, Preisser L, Anegon I, Catala L, Ifrah N *et al.* (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* **110**, 4319–4330.
 - 35 Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Descamps P, Ifrah N, Delneste Y & Jeannin P (2015) IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1 α . *Eur J Immunol* **45**, 1092–1102.
 - 36 Bellora F, Castriconi R, Doni A, Cantoni C, Moretta L, Mantovani A, Moretta A & Bottino C (2012) M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. *Eur J Immunol* **42**, 1618–1626.
 - 37 Preisser L, Miot C, Le Guillou-Guillemette H, Beaumont E, Foucher ED, Garo E, Blanchard S, Fremaux I, Croue A, Fouchard I *et al.* (2014) IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* **60**, 1879–1890.
 - 38 Vignaud JM, Marie B, Klein N, Plenat F, Pech M, Borrelly J, Martinet N, Duprez A & Martinet Y (1994) The role of platelet-derived growth factor production by tumor-associated macrophages in tumor stroma formation in lung cancer. *Cancer Res* **54**, 5455–5463.
 - 39 Pickup M, Novitskiy S & Moses HL (2013) The roles of TGF β in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* **13**, 788–799.
 - 40 Cardoso AC, Andrade LN, Bustos SO & Chammas R (2016) Galectin-3 determines tumor cell adaptive strategies in stressed tumor microenvironments. *Front Oncol* **6**, 127.
 - 41 Wang B, Xu W, Tan M, Xiao Y, Yang H & Xia TS (2015) Integrative genomic analyses of a novel cytokine, interleukin-34 and its potential role in cancer prediction. *Int J Mol Med* **35**, 92–102.
 - 42 Stutchfield BM, Antoine DJ, Mackinnon AC, Gow DJ, Bain CC, Hawley CA, Hughes MJ, Francis B, Wojtacha D, Man TY *et al.* (2015) CSF1 restores innate immunity after liver injury in mice and serum levels indicate outcomes of patients with acute liver failure. *Gastroenterology* **149**, 1896–1909.e1814.
 - 43 Hashimoto D, Chow A, Greter M, Saenger Y, Kwan WH, Leboeuf M, Ginhoux F, Ochando JC, Kunisaki Y, van Rooijen N *et al.* (2011) Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Exp Med* **208**, 1069–1082.
 - 44 Wynn TA & Vannella KM (2016) Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462.
 - 45 Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Muller W, Roers A & Eming SA (2010) Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* **184**, 3964–3977.
 - 46 Vogelpoel LT, Hansen IS, Rispens T, Muller FJ, van Capel TM, Turina MC, Vos JB, Baeten DL, Kapsenberg ML, de Jong EC *et al.* (2014) Fc gamma receptor-TLR cross-talk elicits pro-inflammatory cytokine production by human M2 macrophages. *Nat Commun* **5**, 5444.
 - 47 Chambers SK (2009) Role of CSF-1 in progression of epithelial ovarian cancer. *Future Oncol* **5**, 1429–1440.
 - 48 Zhu XD, Zhang JB, Zhuang PY, Zhu HG, Zhang W, Xiong YQ, Wu WZ, Wang L, Tang ZY & Sun HC (2008) High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* **26**, 2707–2716.
 - 49 Yang L, Liu Y, An H, Chang Y, Zhang W, Zhu Y, Xu L & Xu J (2016) High expression of colony-stimulating factor 1 receptor associates with unfavorable cancer-specific survival of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* **23**, 1044–1052.
 - 50 Yang L, Wu Q, Xu L, Zhang W, Zhu Y, Liu H, Xu J & Gu J (2015) Increased expression of colony stimulating factor-1 is a predictor of poor prognosis in patients with clear-cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* **15**, 67.
 - 51 Koh YW, Park C, Yoon DH, Suh C & Huh J (2014) CSF-1R expression in tumor-associated macrophages is associated with worse prognosis in classical Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol* **141**, 573–583.
 - 52 Lin EY, Nguyen AV, Russell RG & Pollard JW (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* **193**, 727–740.
 - 53 Pyonteck SM, Gadea BB, Wang HW, Gocheva V, Hunter KE, Tang LH & Joyce JA (2012) Deficiency of the macrophage growth factor CSF-1 disrupts pancreatic neuroendocrine tumor development. *Oncogene* **31**, 1459–1467.

- 54 Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, Qian H, Xue XN & Pollard JW (2006) Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* **66**, 11238–11246.
- 55 Achkova D & Maher J (2016) Role of the colony-stimulating factor (CSF)/CSF-1 receptor axis in cancer. *Biochem Soc Trans* **44**, 333–341.
- 56 Uemura Y, Kobayashi M, Nakata H, Kubota T, Bandobashi K, Saito T & Taguchi H (2006) Effects of GM-CSF and M-CSF on tumor progression of lung cancer: roles of MEK1/ERK and AKT/PKB pathways. *Int J Mol Med* **18**, 365–373.
- 57 Rovidia E (2015) Colony-stimulating factor-1 receptor in the polarization of macrophages: a target for turning bad to good ones? *J Clin Cell Immunol* **6**, 379. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000379>
- 58 Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, Rey-Giraud F, Pradel LP, Feuerhake F, Klamann I *et al.* (2014) Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer Cell* **25**, 846–859.
- 59 Moughon DL, He H, Schokrpur S, Jiang ZK, Yaqoob M, David J, Lin C, Iruela-Arispe ML, Dorigo O & Wu L (2015) Macrophage blockade using CSF1R inhibitors reverses the vascular leakage underlying malignant ascites in late-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **75**, 4742–4752.
- 60 Strachan DC, Ruffell B, Oei Y, Bissell MJ, Coussens LM, Pryer N & Daniel D (2013) CSF1R inhibition delays cervical and mammary tumor growth in murine models by attenuating the turnover of tumor-associated macrophages and enhancing infiltration by CD8⁺ T cells. *Oncoimmunology* **2**, e26968.
- 61 Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, Olson OC, Quick ML, Huse JT, Teijeiro V *et al.* (2013) CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* **19**, 1264–1272.
- 62 Stafford JH, Hirai T, Deng L, Chernikova SB, Urata K, West BL & Brown JM (2016) Colony stimulating factor 1 receptor inhibition delays recurrence of glioblastoma after radiation by altering myeloid cell recruitment and polarization. *Neuro Oncol* **18**, 797–806.
- 63 Mok S, Koya RC, Tsui C, Xu J, Robert L, Wu L, Graeber T, West BL, Bollag G & Ribas A (2014) Inhibition of CSF-1 receptor improves the antitumor efficacy of adoptive cell transfer immunotherapy. *Cancer Res* **74**, 153–161.
- 64 Mok S, Tsoi J, Koya RC, Hu-Lieskovan S, West BL, Bollag G, Graeber TG & Ribas A (2015) Inhibition of colony stimulating factor-1 receptor improves antitumor efficacy of BRAF inhibition. *BMC Cancer* **15**, 356.
- 65 Weizman N, Krelin Y, Shabtay-Orbach A, Amit M, Binenbaum Y, Wong RJ & Gil Z (2014) Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* **33**, 3812–3819.
- 66 Escamilla J, Schokrpur S, Liu C, Priceman SJ, Moughon D, Jiang Z, Pouliot F, Magyar C, Sung JL, Xu J *et al.* (2015) CSF1 receptor targeting in prostate cancer reverses macrophage-mediated resistance to androgen blockade therapy. *Cancer Res* **75**, 950–962.
- 67 DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhwani N, Keil SD, Junaid SA *et al.* (2011) Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov* **1**, 54–67.
- 68 Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, Nywening TM, West BL, Luo J, Wang-Gillam A, Goedegebuure SP, Linehan DC & DeNardo DG (2014) CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res* **74**, 5057–5069.
- 69 Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg AM, Ries CH & Ruttinger D (2017) Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J Immunother Cancer* **5**, 53.
- 70 Cassier PA, Italiano A, Gomez-Roca CA, Le Tourneau C, Toulmonde M, Cannarile MA, Ries C, Brillouet A, Muller C, Jegg AM *et al.* (2015) CSF1R inhibition with emactuzumab in locally advanced diffuse-type tenosynovial giant cell tumours of the soft tissue: a dose-escalation and dose-expansion phase I study. *Lancet Oncol* **16**, 949–956.
- 71 Chihara T, Suzu S, Hassan R, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Motoyoshi K, Kimura F & Okada S (2010) IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ* **17**, 1917–1927.
- 72 Segaliny AI, Brion R, Mortier E, Maillason M, Cherel M, Jacques Y, Le Goff B & Heymann D (2015) Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 1010–1021.
- 73 Nandi S, Gokhan S, Dai XM, Wei S, Enikolopov G, Lin H, Mehler MF & Stanley ER (2012) The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Dev Biol* **367**, 100–113.
- 74 Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS & Colonna M (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol* **13**, 753–760.

- 75 Bezie S, Picarda E, Ossart J, Tesson L, Usal C, Renaudin K, Anegon I & Guillonnet C (2015) IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J Clin Invest* **125**, 3952–3964.
- 76 Guillonnet C, Bezie S & Anegon I (2017) Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. *Cell Mol Life Sci* **74**, 2569–2586.
- 77 Yu G, Bing Y, Zhu S, Li W, Xia L, Li Y & Liu Z (2015) Activation of the interleukin-34 inflammatory pathway in response to influenza A virus infection. *Am J Med Sci* **349**, 145–150.
- 78 Zwicker S, Martinez GL, Bosma M, Gerling M, Clark R, Majster M, Soderman J, Almer S & Bostrom EA (2015) Interleukin 34: a new modulator of human and experimental inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Lond)* **129**, 281–290.
- 79 Zhang F, Ding R, Li P, Ma C, Song D, Wang X, Ma T & Bi L (2015) Interleukin-34 in rheumatoid arthritis: potential role in clinical therapy. *Int J Clin Exp Med* **8**, 7809–7815.
- 80 Wang H, Cao J & Lai X (2016) Serum interleukin-34 levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Molecules* **22**, 35.
- 81 Ciccio F, Alessandro R, Rodolico V, Guggino G, Raimondo S, Guarnotta C, Giardina A, Sireci G, Campisi G, De Leo G *et al.* (2013) IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14 (bright)CD16+ monocytes. *Rheumatology (Oxford)* **52**, 1009–1017.
- 82 Cheng ST, Tang H, Ren JH, Chen X, Huang AL & Chen J (2017) Interleukin-34 inhibits hepatitis B virus replication in vitro and in vivo. *PLoS One* **12**, e0179605.
- 83 Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Garo E, Ifrah N, Guardiola P, Delneste Y & Jeannin P (2013) IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS One* **8**, e56045.
- 84 Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, Ponsoda S, Delneste Y, Hebbard M & Jeannin P (2009) Interferon- γ reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int J Cancer* **125**, 367–373.
- 85 Zhou SL, Hu ZQ, Zhou ZJ, Dai Z, Wang Z, Cao Y, Fan J, Huang XW & Zhou J (2016) miR-28-5p-IL-34-macrophage feedback loop modulates hepatocellular carcinoma metastasis. *Hepatology* **63**, 1560–1575.
- 86 Baghdadi M, Wada H, Nakanishi S, Abe H, Han N, Putra WE, Endo D, Watari H, Sakuragi N, Hida Y *et al.* (2016) Chemotherapy-induced IL34 enhances immunosuppression by tumor-associated macrophages and mediates survival of chemoresistant lung cancer cells. *Cancer Res* **76**, 6030–6042.
- 87 Lavin Y, Mortha A, Rahman A & Merad M (2015) Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* **15**, 731–744.
- 88 Williams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H & Lambrecht BN (2013) Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* **210**, 1977–1992.
- 89 Egea L, Hirata Y & Kagnoff MF (2010) GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **4**, 723–731.
- 90 Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thirupathi M, Alharshawi K, Elshabrawy H, Holterman MJ & Prabhakar BS (2015) Dual role of GM-CSF as a pro-inflammatory and a regulatory cytokine: implications for immune therapy. *J Interferon Cytokine Res* **35**, 585–599.
- 91 Becher B, Tugues S & Greter M (2016) GM-CSF: from growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity* **45**, 963–973.
- 92 Reynolds G, Gibbon JR, Pratt AG, Wood MJ, Coady D, Raftery G, Lorenzi AR, Gray A, Filer A, Buckley CD *et al.* (2016) Synovial CD4+ T-cell-derived GM-CSF supports the differentiation of an inflammatory dendritic cell population in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **75**, 899–907.
- 93 Cook AD, Turner AL, Braine EL, Pobjoy J, Lenzo JC & Hamilton JA (2011) Regulation of systemic and local myeloid cell subpopulations by bone marrow cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **63**, 2340–2351.
- 94 Bischof RJ, Zafiroopoulos D, Hamilton JA & Campbell IK (2000) Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation. *Clin Exp Immunol* **119**, 361–367.
- 95 Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Dunn AR, Grail D & Hamilton JA (1998) Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol* **161**, 3639–3644.
- 96 Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, Hepp J, Baeuerle PA & van den Berg WB (2007) GM-CSF neutralisation suppresses inflammation and protects cartilage in acute streptococcal cell wall arthritis of mice. *Ann Rheum Dis* **66**, 452–457.
- 97 El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN & Rostami A (2011) The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent

- on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* **12**, 568–575.
- 98 Noster R, Riedel R, Mashreghi MF, Radbruch H, Harms L, Haftmann C, Chang HD, Radbruch A & Zielinski CE (2014) IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med* **6**, 241ra280.
 - 99 Ifergan I, Davidson TS, Kebir H, Xu D, Palacios-Macapagal D, Cann J, Rodgers JM, Hunter ZN, Pittet CL, Beddow S *et al.* (2017) Targeting the GM-CSF receptor for the treatment of CNS autoimmunity. *J Autoimmun* **84**, 1–11.
 - 100 Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA & Cook AD (2007) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* **178**, 5245–5252.
 - 101 Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R & Ottenhoff TH (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4560–4565.
 - 102 Palucka K & Banchereau J (2013) Human dendritic cell subsets in vaccination. *Curr Opin Immunol* **25**, 396–402.
 - 103 Palucka K & Banchereau J (2013) Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* **39**, 38–48.
 - 104 Greter M, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, Agudo-Cantero J, Bogunovic M, Gautier EL, Miller J, Leboeuf M *et al.* (2012) GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* **36**, 1031–1046.
 - 105 Yan WL, Shen KY, Tien CY, Chen YA & Liu SJ (2017) Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* **9**, 347–360.
 - 106 Salgia R, Lynch T, Skarin A, Lucca J, Lynch C, Jung K, Hodi FS, Jaklitsch M, Mentzer S, Swanson S *et al.* (2003) Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* **21**, 624–630.
 - 107 Hong IS (2016) Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp Mol Med* **48**, e242.
 - 108 Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, Jung K, Gillessen S, Singer S, Tanabe K, Duda R, Mentzer S, Jaklitsch M *et al.* (2003) Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **21**, 3343–3350.
 - 109 Simons JW, Mikhak B, Chang JF, DeMarzo AM, Carducci MA, Lim M, Weber CE, Baccala AA, Goemann MA, Clift SM *et al.* (1999) Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer. *Cancer Res* **59**, 5160–5168.
 - 110 Bhattacharya P, Thirupathi M, Elshabrawy HA, Alharshawi K, Kumar P & Prabhakar BS (2015) GM-CSF: An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity. *Cytokine* **75**, 261–271.
 - 111 Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, Stanger BZ & Vonderheide RH (2012) Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. *Cancer Cell* **21**, 822–835.
 - 112 Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G & Bar-Sagi D (2012) Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer Cell* **21**, 836–847.
 - 113 Urdinguio RG, Fernandez AF, Moncada-Pazos A, Huidobro C, Rodriguez RM, Ferrero C, Martinez-Cambor P, Obaya AJ, Bernal T, Parra-Blanco A *et al.* (2013) Immune-dependent and independent antitumor activity of GM-CSF aberrantly expressed by mouse and human colorectal tumors. *Cancer Res* **73**, 395–405.
 - 114 Boneberg EM, Hareng L, Gantner F, Wendel A & Hartung T (2000) Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood* **95**, 270–276.
 - 115 Kast RE, Hill QA, Wion D, Mellstedt H, Focosi D, Karpel-Massler G, Heiland T & Halatsch ME (2017) Glioblastoma-synthesized G-CSF and GM-CSF contribute to growth and immunosuppression: Potential therapeutic benefit from dapsone, fenofibrate, and ribavirin. *Tumour Biol* **39**, 1010428317699797.
 - 116 Martins A, Han J & Kim SO (2010) The multifaceted effects of granulocyte colony-stimulating factor in immunomodulation and potential roles in intestinal immune homeostasis. *IUBMB Life* **62**, 611–617.
 - 117 Rossetti M, Gregori S & Roncarolo MG (2010) Granulocyte-colony stimulating factor drives the in vitro differentiation of human dendritic cells that induce anergy in naive T cells. *Eur J Immunol* **40**, 3097–3106.
 - 118 Rutella S, Bonanno G, Pierelli L, Mariotti A, Capoluongo E, Contemi AM, Ameglio F, Curti A, De Ritis DG, Voso MT *et al.* (2004) Granulocyte colony-

- stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN- α . *Eur J Immunol* **34**, 1291–1302.
- 119 Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE & Anasetti C (2000) Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* **95**, 2484–2490.
 - 120 Morris ES, MacDonald KP, Rowe V, Johnson DH, Banovic T, Clouston AD & Hill GR (2004) Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance. *Blood* **103**, 3573–3581.
 - 121 Dejaco C, Lichtenberger C, Miehsler W, Oberhuber G, Herbst F, Vogelsang H, Gangl A & Reinisch W (2003) An open-label pilot study of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of severe endoscopic postoperative recurrence in Crohn's disease. *Digestion* **68**, 63–70.
 - 122 D'Aveni M, Rossignol J, Coman T, Sivakumaran S, Henderson S, Manzo T, Santos e Sousa P, Bruneau J, Fouquet G, Zavala F *et al.* (2015) G-CSF mobilizes CD34⁺ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Sci Transl Med* **7**, 281ra242.
 - 123 Kared H, Adle-Biasette H, Fois E, Masson A, Bach JF, Chatenoud L, Schneider E & Zavala F (2006) Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity* **25**, 823–834.
 - 124 Kared H, Masson A, Adle-Biasette H, Bach JF, Chatenoud L & Zavala F (2005) Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells. *Diabetes* **54**, 78–84.
 - 125 Yan JJ, Jambaldorj E, Lee JG, Jang JY, Shim JM, Han M, Koo TY, Ahn C & Yang J (2016) Granulocyte colony-stimulating factor treatment ameliorates lupus nephritis through the expansion of regulatory T cells. *BMC Nephrol* **17**, 175.
 - 126 Bharadwaj U, Li M, Zhang R, Chen C & Yao Q (2007) Elevated interleukin-6 and G-CSF in human pancreatic cancer cell conditioned medium suppress dendritic cell differentiation and activation. *Cancer Res* **67**, 5479–5488.
 - 127 Ninci EB, Brandstetter T, Meinhold-Heerlein I, Bettendorf H, Sellin D & Bauknecht T (2000) G-CSF receptor expression in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **10**, 19–26.
 - 128 Sugimoto C, Fujieda S, Sunaga H, Noda I, Tanaka N, Kimura Y, Saito H & Matsukawa S (2001) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mediated signaling regulates type IV collagenase activity in head and neck cancer cells. *Int J Cancer* **93**, 42–46.
 - 129 Morris KT, Khan H, Ahmad A, Weston LL, Nofchissey RA, Pinchuk IV & Beswick EJ (2014) G-CSF and G-CSFR are highly expressed in human gastric and colon cancers and promote carcinoma cell proliferation and migration. *Br J Cancer* **110**, 1211–1220.
 - 130 Zhang L, Agarwal S, Shohet JM & Zage PE (2015) CD114 expression mediates melanoma tumor cell growth and treatment resistance. *Anticancer Res* **35**, 3787–3792.
 - 131 Hsu DM, Agarwal S, Benham A, Coarfa C, Trahan DN, Chen Z, Stowers PN, Courtney AN, Lakoma A, Barbieri E *et al.* (2013) G-CSF receptor positive neuroblastoma subpopulations are enriched in chemotherapy-resistant or relapsed tumors and are highly tumorigenic. *Cancer Res* **73**, 4134–4146.
 - 132 Zage PE, Whittle SB & Shohet JM (2017) CD114: a new member of the neural crest-derived cancer stem cell marker family. *J Cell Biochem* **118**, 221–231.
 - 133 Hollmen M, Karaman S, Schwager S, Lisibach A, Christiansen AJ, Maksimow M, Varga Z, Jalkanen S & Detmar M (2016) G-CSF regulates macrophage phenotype and associates with poor overall survival in human triple-negative breast cancer. *Oncoimmunology* **5**, e1115177.
 - 134 Morris KT, Castillo EF, Ray AL, Weston LL, Nofchissey RA, Hanson JA, Samedi VG, Pinchuk IV, Hudson LG & Beswick EJ (2015) Anti-G-CSF treatment induces protective tumor immunity in mouse colon cancer by promoting protective NK cell, macrophage and T cell responses. *Oncotarget* **6**, 22338–22347.
 - 135 Lawlor KE, Campbell IK, Metcalf D, O'Donnell K, van Nieuwenhuijze A, Roberts AW & Wicks IP (2004) Critical role for granulocyte colony-stimulating factor in inflammatory arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11398–11403.
 - 136 Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ & Hamilton JA (2000) The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol* **68**, 144–150.
 - 137 Delneste Y, Charbonnier P, Herbault N, Magistrelli G, Caron G, Bonnefoy JY & Jeannin P (2003) Interferon- γ switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood* **101**, 143–150.
 - 138 Chomarat P, Banchereau J, Davoust J & Palucka AK (2000) IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* **1**, 510–514.
 - 139 Cheng F, Wang HW, Cuenca A, Huang M, Ghansah T, Brayer J, Kerr WG, Takeda K, Akira S, Schoenberger SP *et al.* (2003) A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* **19**, 425–436.

- 140 Iwata-Kajihara T, Sumimoto H, Kawamura N, Ueda R, Takahashi T, Mizuguchi H, Miyagishi M, Takeda K & Kawakami Y (2011) Enhanced cancer immunotherapy using STAT3-depleted dendritic cells with high Th1-inducing ability and resistance to cancer cell-derived inhibitory factors. *J Immunol* **187**, 27–36.
- 141 Sica A & Bronte V (2007) Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* **117**, 1155–1166.
- 142 Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, Niu G, Kay H, Mule J, Kerr WG *et al.* (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med* **11**, 1314–1321.
- 143 Takaishi K, Komohara Y, Tashiro H, Ohtake H, Nakagawa T, Katabuchi H & Takeya M (2010) Involvement of M2-polarized macrophages in the ascites from advanced epithelial ovarian carcinoma in tumor progression via Stat3 activation. *Cancer Sci* **101**, 2128–2136.
- 144 Rojo R, Pridans C, Langlais D & Hume DA (2017) Transcriptional mechanisms that control expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor locus. *Clin Sci (Lond)* **131**, 2161–2182.
- 145 Rovida E, Paccagnini A, Del Rosso M, Peschon J & Dello Sbarba P (2001) TNF- α -converting enzyme cleaves the macrophage colony-stimulating factor receptor in macrophages undergoing activation. *J Immunol* **166**, 1583–1589.
- 146 Brocheriou I, Maouche S, Durand H, Braunersreuther V, Le Naour G, Gratchev A, Koskas F, Mach F, Kzhyshkowska J & Ninio E (2011) Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **214**, 316–324.
- 147 Gliniak BC & Rohrschneider LR (1990) Expression of the M-CSF receptor is controlled posttranscriptionally by the dominant actions of GM-CSF or multi-CSF. *Cell* **63**, 1073–1083.
- 148 Gliniak BC, Park LS & Rohrschneider LR (1992) A GM-colony-stimulating factor (CSF) activated ribonuclease system transregulates M-CSF receptor expression in the murine FDC-P1/MAC myeloid cell line. *Mol Biol Cell* **3**, 535–544.
- 149 Swierczak A, Cook AD, Lenzo JC, Restall CM, Doherty JP, Anderson RL & Hamilton JA (2014) The promotion of breast cancer metastasis caused by inhibition of CSF-1R/CSF-1 signaling is blocked by targeting the G-CSF receptor. *Cancer Immunol Res* **2**, 765–776.
- 150 Mantovani A & Allavena P (2015) The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med* **212**, 435–445.
- 151 Weiskopf K & Weissman IL (2015) Macrophages are critical effectors of antibody therapies for cancer. *MAbs* **7**, 303–310.
- 152 Gul N & van Egmond M (2015) Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages: a potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Res* **75**, 5008–5013.
- 153 Leidi M, Gotti E, Bologna L, Miranda E, Rimoldi M, Sica A, Roncalli M, Palumbo GA, Introna M & Golay J (2009) M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *J Immunol* **182**, 4415–4422.
- 154 Kitoh Y, Saio M, Gotoh N, Umemura N, Nonaka K, Bai J, Vizkeleti L, Torocsik D, Balazs M, Adany R *et al.* (2011) Combined GM-CSF treatment and M-CSF inhibition of tumor-associated macrophages induces dendritic cell-like signaling in vitro. *Int J Oncol* **38**, 1409–1419.
- 155 Riepsaame J, van Oudenaren A, den Broeder BJ, van Ijcken WF, Pothof J & Leenen PJ (2013) MicroRNA-mediated down-regulation of M-CSF receptor contributes to maturation of mouse monocyte-derived dendritic cells. *Front Immunol* **4**, 353.
- 156 Pickl WF, Majdic O & Knapp W (2001) Dendritic cell generation from highly purified CD14⁺ monocytes. *Methods Mol Med* **64**, 283–296.
- 157 Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677–686.
- 158 Bottazzi B, Erba E, Nobili N, Fazioli F, Rambaldi A & Mantovani A (1990) A paracrine circuit in the regulation of the proliferation of macrophages infiltrating murine sarcomas. *J Immunol* **144**, 2409–2412.
- 159 Campbell MJ, Tonlaar NY, Garwood ER, Huo D, Moore DH, Khramtsov AI, Au A, Bachner F, Chen Y, Malaka DO *et al.* (2011) Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* **128**, 703–711.

9. Table des matières

1. Abréviations	7
2. Avant-propos	11
3. Introduction	13
a. Généralités sur le système immunitaire	13
1. Les acteurs cellulaires	15
2. Les acteurs moléculaires	20
b. Biologie des macrophages	24
i. Origine(s)	24
1. Ontogénie des macrophages	24
2. Facteurs de survie et de différenciation	26
ii. Diversités phénotypiques et rôles physiologiques des macrophages	28
1. Rôles physiologiques des macrophages	28
2. Dichotomie M1-M2	34
iii. Rôles pathologiques des macrophages	42
1. Cancer	42
2. Maladies Inflammatoires chroniques	44
3. Ciblage thérapeutique des macrophages	46
c. Les corps cétoniques	47
i. Généralités	47
ii. Synthèse et rôles des corps cétoniques	48
1. Définition/synthèse	48
2. Rôles des corps cétoniques	50
iii. Diète Cétogène	55
4. Contexte et objectifs	61
5. Résultats	63
a. Etude 1 : Impact du régime cétogène sur la cicatrisation et rôle de l'acétoacétate sur la génération de macrophages réparateurs	63
i. Contexte et objectifs de l'étude	63
ii. Résultats de l'étude	63
1. L'acétoacétate induit l'expression de molécules impliquées dans les processus de réparation/cicatrisation par les macrophages humains	63
2. L'acétoacétate induit l'expression de molécules impliquées dans la cicatrisation indépendamment de l'empreinte cytokinique	66
3. L'acétoacétate augmente la respiration oxydative des macrophages humains	67
4. L'acquisition d'un profil réparateur et cicatrisant est induite par l'acétoacétate, mais pas par le β -hydroxybutyrate	68
5. Le régime cétogène et l'acétoacétate accélèrent la cicatrisation tissulaire	69
6. Conclusion de l'étude	71
iii. Figure supplémentaire et matériel et méthodes	71
1. Figure supplémentaire	71

2.	Isolement monocyttaire et génération des cellules humaines	72
3.	Génération des macrophages murins	73
4.	Culture en corps cétoniques	73
5.	Quantification des cytokines	73
6.	Analyse de cytométrie en flux	73
7.	Test activité phagocytaire	74
8.	Analyse de l'expression des ARNm	74
9.	Mesure du taux de consommation d'oxygène (oxygen consumption rate, OCR)	74
10.	Quantification des taux sériques des corps cétoniques	75
11.	Modèle animal de cicatrisation	75
12.	Statistiques	75

b. Etude 2 : L'acétoacétate protège les macrophages humains d'un état de pseudo-starvation induit par une acidose lactique

i.	Contexte et objectifs de l'étude	76
ii.	Résumé des résultats de l'étude	76
1.	Les macrophages humains en acidose lactique présentent une masse mitochondriale réduite	76
2.	L'expression des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale n'est pas modulée en acidose lactique	77
3.	L'acide lactique induit une dysfonction des mitochondries	78
4.	L'acidose lactique amplifie le flux autophagique	78
5.	L'autophagie est indispensable à la survie des macrophages humains en acidose lactique	79
6.	Les macrophages en acidose lactique présentent un changement métabolique et physique typique des cellules en famine	79
7.	L'acide lactique réduit drastiquement la capture de nutriments par les macrophages humains	80
8.	Un pH extracellulaire acide conduit à une acidification intracellulaire transitoire	80
9.	L'acétoacétate protège les macrophages humains de la mitochophagie et d'un état de pseudo-starvation induits par l'acidose lactique	81
10.	L'acétoacétate n'affecte pas le phénotype des macrophages exposés à l'acide lactique	81
11.	Conclusion de l'étude	82
iii.	Manuscrit (article soumis à la revue Nature Communication)	82

6. Discussion et perspectives

a. Rôle de l'acétoacétate sur les fonctions effectrices des macrophages, impact du régime cétoène sur la cicatrisation

i.	L'acétoacétate modifie le phénotype immunitaire des macrophages	129
ii.	Le profil phénotypique induit par l'acétoacétate est différent de celui des macrophages réparateurs prototypes.	130
iii.	Effet universel de l'acétoacétate sur les macrophages	130
iv.	Effets de l'acétoacétate sur la respiration oxydative cellulaire	131
v.	L'effet de l'acétoacétate n'est pas mimé par le β -hydroxybutyrate	132
vi.	Impact du régime cétoène et de l'acétoacétate sur la cicatrisation	132
vii.	Conclusion	133
viii.	Perspectives	133

b. Rôle de l'acétoacétate sur le métabolisme des macrophages humains dans un contexte d'acidose lactique

i.	L'acidose lactique induit un état de pseudo-starvation	136
ii.	L'autophagie induite par l'acidose lactique permet la survie cellulaire	137

iii. Les macrophages en acidose lactique présentent des dysfonctions mitochondriales qui sont prévenues par l'acétoacétate	137
iv. Conclusion	138
v. Perspectives	138
7. Références bibliographiques	141
8. Annexes	159
a. Annexe 1: Lactic acidosis cooperates with GM-CSF and M-CSF to induce human macrophages with an inflammatory and pro-tumor phenotype, Paolini L, Adam C et al (article soumis à la revue Cancer Immunology Research)	159
b. Annexe2 : The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophage, Jeannin P et al, revue publiée dans la revue FEBS Journal	162
Table des illustrations	168
Table des tableaux	170

Table des illustrations

Figure 1 : L'immunité innée et l'immunité adaptative. Le système immunitaire est constitué de deux composantes, l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée intervient dans les premières minutes suivant la détection d'un signal de danger et est peu spécifique. Elle comprend les cellules phagocytaires ainsi que les barrières épithéliales. Les cellules présentatrices d'antigènes présentent les antigènes aux lymphocytes T, permettant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Les cellules effectrices sont les lymphocytes B représentant le bras humoral et les lymphocytes T représentant le bras cellulaire ; les lymphocytes sont le support de la mémoire immunologique. D'après Abbas A.K LAH, Pillai S (2013), Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.	14
Figure 2 : Ontogénie des macrophages chez la souris. Dès les premiers stades embryonnaires, au cours de l'hématopoïèse primitive, les premiers macrophages sont formés et permettent la formation de la microglie chez l'adulte. Une deuxième vague, à partir des progéniteurs érythromyéloïdes (EMP) qui sont formés dans le sac vitellin donnent les macrophages tissulaires et les premiers monocytes fœtaux via les EMP tardifs. Enfin, la troisième vague permet la génération de monocytes et de macrophages issus des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Figure adaptée (Hoeffel and Ginhoux, 2018).	26
Figure 3 : Les facteurs de survie et de différenciation des macrophages humains. Représentation graphique des effets du M-CSF, de l'IL-34 et du GM-CSF sur la génération de macrophages M2 et M1, respectivement. Schéma tiré de (Jeannin et al., 2018).	28
Figure 4 : Propriétés et fonctions des macrophages. Les macrophages sont des cellules d'origine myéloïde, intervenant dans l'immunité innée, avec des propriétés de phagocytose et de sécrétion de médiateurs solubles trophiques, pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. Les macrophages étant également des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), ils permettent l'élaboration d'une réponse immunitaire adaptative. Toutes ces propriétés confèrent aux macrophages de nombreuses fonctions au cours de processus physiologiques...	29
Figure 5 : Mécanismes de réparation tissulaire et de cicatrisation. Résumé de la réparation tissulaire et de la cicatrisation qui est composée d'un enchaînement de 4 étapes : l'hémostase, l'inflammation (A), la formation tissulaire (B) et le remodelage tissulaire (C). Les macrophages ont un rôle crucial dans chacune de ces étapes. Ils interviennent dans le recrutement et la mise en place d'une réponse inflammatoire, de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et de la prolifération des kératinocytes à l'origine de la fermeture de la blessure et du tissu néoformé et ils participent enfin au remodelage tissulaire. Figure adapté de (Minutti et al., 2017).	32
Figure 6 : La classification des macrophages. Au début des années 2000, une classification des macrophages est proposée sur la base de la classification lymphocytaire Th1/Th2 (A) (Mantovani et al., 2002), elle oppose les macrophages M1 aux macrophages M2, autrement dit les macrophages aux propriétés inflammatoires résultant d'une activation classique (IFN γ ou LPS) aux macrophages ayant des propriétés immunosuppressives à la suite d'une activation alternative (IL-4). En 2008, une étude propose une évolution de la classification des macrophages en 3 dimensions (B) (Mosser and Edwards, 2008). Elle met en évidence les nombreux profils macrophagiques par l'utilisation d'un nuancier de couleurs évoluant autour de 3 pôles représentant 3 catégories : les macrophages classiquement activés, les macrophages réparateurs et les macrophages régulateurs. Figure adaptée de (Mosser and Edwards, 2008).	35
Figure 7 : Les différentes sous-populations de macrophages humains, leurs phénotypes et leurs rôles dans l'inflammation. Une classification en deux dimensions oppose les macrophages M1 et M1-like au macrophages M2a, M2b, M2c et M2-like. Chaque sous-population est générée en présence de différents inducteurs à l'origine d'un phénotype défini par l'expression de différents marqueurs s'inscrivant dans un continuum allant de l'inflammation à l'immunorégulation ou la réparation tissulaire. Figure élaborée d'après (Mantovani et al., 2004b).	38

Figure 8 : Origine des macrophages humains et murins, tissulaires ou générés in vitro. Chez l'Homme, les macrophages tissulaires sont isolés essentiellement de patients, à la suite de biopsies ou d'exérèses. La génération in vitro de macrophages se réalise à partir de monocytes du sang périphérique de sujets sains ou de patients en présence de facteurs de survie et de différenciation, GM-CSF pour les macrophages inflammatoires et M-CSF et/ou IL-34 pour les macrophages immunorégulateur/réparateurs. Chez la souris, des macrophages tissulaires peuvent être isolés des tissus. Les macrophages peuvent être générés in vitro à partir de monocytes isolés de la moelle osseuse et leur différenciation en présence de M-CSF et du facteur de polarisation. GM-CSF induit une population hétérogène exprimant des marqueurs macrophagiques et de cellules dendritiques..... 39

Figure 9 : Rôles des TAM dans la tumorigénèse. Les TAM au sein du microenvironnement tumoral ont divers rôles permettant la génération et le recrutement de cellules immunitaires immunorégulatrices et inhibant les fonctions des cellules effectrices. Ils favorisent également la migration, l'invasion, la croissance tumorales via la sécrétion de facteurs trophiques et des métalloprotéases. Figure adaptée de (Mantovani et al., 2017). 44

Figure 10: Synthèse et métabolisation des corps cétoniques. Résumé des voies conduisant à la formation des corps cétoniques dans les hépatocytes, leur libération dans la circulation générale et leur métabolisation dans les tissus extra-hépatiques. Figure adaptée de (Newman and Verdin, 2014a). 50

Figure 11 : Rôles directs et indirects du β -OHB. Résumé graphique des différents rôles décrit par le β -OHB. Ces rôles sont représentés sous deux catégories, les rôles directs avec l'inhibition des Histones Désacétylases de Classe I, la β -Hydroxybutyrylation des protéines et la liaison aux récepteurs FFAR3 et HCAR2. Les rôles indirects du β -OHB sont la synthèse de neurotransmetteur, l'augmentation du pool d'acétyl-CoA permettant l'acétylation protéiques. Figure adaptée de (Newman and Verdin, 2017). 52

Table des tableaux

Tableau 1 : Les récepteurs ou molécules intervenant comme senseurs de l'immunité innée et les principaux membres de leur famille.	22
Tableau 2 : Phénotype des macrophages issus de l'Homme et de la souris.	42
Tableau 3 : Stratégies thérapeutiques visant les macrophages dans un contexte de pathologie chronique (cancer ou inflammation).	47

RÉSUMÉ

En cas d'inflammation ou de lésion, les macrophages doivent s'adapter et fonctionner dans un environnement hostile, par exemple acide. En effet, une production excessive et une accumulation locale d'acide lactique caractérise le processus inflammatoire et les lésions tissulaires. Actuellement, l'adaptation métabolique des monocytes et des macrophages humains à l'acidose et la nature des facteurs leur permettant d'acquérir un profil réparateur sont méconnus. Nous montrons dans cette étude que les monocytes différenciés in vitro en macrophages en présence du corps cétonique acétoacétate présentent une augmentation de la phosphorylation oxydative associée à l'acquisition d'un profil réparateur prononcé. De plus, des corps cétoniques et l'acétoacétate accélèrent la vitesse de cicatrisation dans modèle in vivo de cicatrisation.

D'un point de vue mécanistique, les monocytes différenciés en acidose lactique accumulent des mitochondries dépolarisées et présentent des signes de mitophagie ainsi qu'une importante réduction de l'absorption des nutriments rendant leur survie dépendante de l'autophagie. De manière intéressante, l'acétoacétate prévient les conséquences du stress acide (maintien de l'intégrité et de la fonction mitochondriale), permettant aux cellules de survivre sans avoir recours à l'autophagie. L'acétoacétate apparaît donc comme un métabolite unique pour améliorer la tolérance des cellules et des tissus aux dommages induits par l'acidose et un facteur local favorisant la génération de macrophages présentant un profil réparateur.

mots-clés : macrophages, acidose lactique, acétoacétate, réparation tissulaire, cicatrisation, mitochondries, starvation

ABSTRACT

In case of inflammation or injury, macrophages must adapt and function in a hostile environment, such as an acidic environment. Indeed, excessive production and local accumulation of lactic acid, is a characteristic of inflammatory process and tissue damage. Currently, the metabolic adaptation of human monocytes and macrophages to acidosis and the nature of the factors that enable them to acquire a repair profile are poorly understood. In this study, we show that monocytes differentiated in vitro into macrophages in the presence of the acetoacetate, a ketone body produced by the liver, show an increase in oxidative phosphorylation associated with the acquisition of a pronounced repair profile. In addition, ketone bodies and acetoacetate accelerate the rate of healing in an in vivo healing model. From a mechanistic point of view, monocytes differentiated into lactic acidosis accumulate depolarized mitochondria and show signs of mitophagy as well as a significant reduction in nutrient absorption making their survival dependent on autophagy. Interestingly, acetoacetate prevents the consequences of acid stress (maintaining integrity and mitochondrial function), allowing cells to survive without resorting to autophagy. Acetoacetate therefore appears as a unique metabolite to improve the tolerance of cells and tissues to damage induced by acidosis and a local factor promoting the generation of macrophages with a repair profile.

keywords : macrophages, lactic acidosis, acetoacetate, tissue repair, wound healing, mitochondria, starvation

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Clément ADAM
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **28 / 10 / 2019**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Impact de l'acétoacétate sur la biologie des macrophages humains : analyse phénotypique et métabolique

Mots clés : macrophages, acidose lactique, acétoacétate, réparation tissulaire, cicatrisation, mitochondries, starvation

Résumé : En cas d'inflammation ou de lésion, les macrophages doivent s'adapter et fonctionner dans un environnement hostile, par exemple acide. En effet, une production excessive et une accumulation locale d'acide lactique caractérise le processus inflammatoire et les lésions tissulaires. Actuellement, l'adaptation métabolique des monocytes et des macrophages humains à l'acidose et la nature des facteurs leur permettant d'acquérir un profil réparateur sont méconnus. Nous montrons dans cette étude que les monocytes différenciés *in vitro* en macrophages en présence du corps cétonique acétoacétate présentent une augmentation de la phosphorylation oxydative associée à l'acquisition d'un profil réparateur prononcé. De plus, des corps cétoniques et l'acétoacétate accélèrent la vitesse de cicatrisation dans modèle *in vivo* de cicatrisation.

D'un point de vue mécanistique, les monocytes différenciés en acidose lactique accumulent des mitochondries dépolarisées et présentent des signes de mitophagie ainsi qu'une importante réduction de l'absorption des nutriments rendant leur survie dépendante de l'autophagie. De manière intéressante, l'acétoacétate prévient les conséquences du stress acide (maintien de l'intégrité et de la fonction mitochondriale), permettant aux cellules de survivre sans avoir recours à l'autophagie. L'acétoacétate apparaît donc comme un métabolite unique pour améliorer la tolérance des cellules et des tissus aux dommages induits par l'acidose et un facteur local favorisant la génération de macrophages présentant un profil réparateur.

Title : Impact of acetoacetate on the biology of human macrophages: phenotypic and metabolic analysis

Keywords : macrophages, lactic acidosis, acetoacetate, tissue repair, wound healing, mitochondria, starvation

Abstract : In case of inflammation or injury, macrophages must adapt and function in a hostile environment, such as an acidic environment. Indeed, excessive production and local accumulation of lactic acid, is a characteristic of inflammatory process and tissue damage. Currently, the metabolic adaptation of human monocytes and macrophages to acidosis and the nature of the factors that enable them to acquire a repair profile are poorly understood. In this study, we show that monocytes differentiated *in vitro* into macrophages in the presence of the acetoacetate, a ketone body produced by the liver, show an increase in oxidative phosphorylation associated with the acquisition of a pronounced repair profile. In addition, ketone bodies and acetoacetate accelerate the rate of healing in an *in vivo* healing model.

From a mechanistic point of view, monocytes differentiated into lactic acidosis accumulate depolarized mitochondria and show signs of mitophagy as well as a significant reduction in nutrient absorption making their survival dependent on autophagy. Interestingly, acetoacetate prevents the consequences of acid stress (maintaining integrity and mitochondrial function), allowing cells to survive without resorting to autophagy. Acetoacetate therefore appears as a unique metabolite to improve the tolerance of cells and tissues to damage induced by acidosis and a local factor promoting the generation of macrophages with a repair profile.