HAL
open science

Étude de l'implication de l'activateur tissulaire du plasminogène dans la réponse immunitaire

Célia Seillier

▶ **To cite this version:**

Célia Seillier. Étude de l'implication de l'activateur tissulaire du plasminogène dans la réponse immunitaire. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC401 . tel-03631146

HAL Id: tel-03631146

https://theses.hal.science/tel-03631146

Submitted on 5 Apr 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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Etude de l'implication de l'activateur tissulaire du plasminogène dans la réponse immunitaire

Présentée et soutenue par
CELIA SEILLIER

Thèse soutenue le 22/03/2022 devant le jury composé de		
MME CELINE BEAUVILLAIN	Maître de conférences HDR, CHU d'Angers	Rapporteur du jury
M. SEBASTIEN LACROIX-DESMAZES	Directeur de recherche au CNRS, Centre de Recherche des Cordeliers Paris	Rapporteur du jury
MME CÉCILE DENIS	Directeur de recherche à l'INSERM, Université Paris-Saclay	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Président du jury
M. OLIVIER TOUTIRAIS	Maître de conférences, praticien hosp., Université Caen Normandie	Directeur de thèse
MME BRIGITTE LE MAUFF	Professeur des universités PraticienHosp, Université Caen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par OLIVIER TOUTIRAIS (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques) et BRIGITTE LE MAUFF (Université Caen Normandie),

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Inserm
La science pour la santé
From science to health

Table des matières

INTRODUCTION **16**

I. LE SYSTÈME IMMUNITAIRE 1

1. Généralités *1*

2. L'immunité innée *1*

2.1. Les barrières physico-chimiques de l'immunité innée 2

2.2. Les acteurs cellulaires et moléculaires de l'immunité innée 3

2.3. Les macrophages, d'excellents phagocytes 9

2.3.1. Leur découverte par Élie Metchnikoff 9

2.3.2. Les origines tissulaires des macrophages 10

2.3.3. Le phénotype des macrophages, clef de leur identification 12

2.3.4. Leurs fonctions : de l'homéostasie à l'homéostasie, en passant par l'inflammation 15

2.3.4.1. Une nomenclature érigée sur la base de leurs fonctions 19

2.3.4.2. Les macrophages M1 dans l'initiation de l'inflammation 19

2.3.4.3. Les macrophages M2 dans la résolution de l'inflammation 20

2.3.4.4. Des macrophages M1 aux macrophages M2, un *continuum* 25

2.3.5. Le phénotype M1 : pro-inflammatoire 27

2.3.6. Le phénotype M2 : anti-inflammatoire 33

2.4. Les DCs, APCs professionnelles 37

2.4.1. Leur découverte par Ralph Steinman et Zanvil A. Cohn 37

2.4.2. Leur ontogénie 38

2.4.3. Les divers phénotypes attribués aux DCs 39

2.4.3.1. Les cDCs 41

2.4.3.1.1. Les cDC1 41

2.4.3.1.2. Les cDC2 43

2.4.3.2. Les pDCs 43

2.4.3.3. Les DCs inflammatoires ou MoDCs 44

2.4.4. La fonction majeure des DCs : la présentation d'antigènes 46

2.4.4.1. L'importance des molécules du MHCII et de co-stimulation 47

2.4.4.2. Fonction des cDC1 dans la *cross*-présentation d'antigènes et la réponse anti-tumorale 50

2.4.4.3. Fonction des cDC2 dans l'interaction avec les LT $CD4^+$ 51

2.4.4.4. Fonction des pDCs dans l'immunité antivirale et l'auto-immunité 51

2.4.4.5. Fonction des MoDCs dans l'immunité antimicrobienne 53

2.4.5. Concept de DCs immunogènes *versus* tolérogènes 53

2.5. La distinction des macrophages et DCs, un défi de taille 55

II. L'HÉMOSTASE, ACTIVÉE AU COURS DE L'INFLAMMATION 58

1. L'HÉMOSTASE, GÉNÉRALITÉS 58

1.1. La première étape : l'hémostase primaire 59

1.2. La seconde étape : l'hémostase secondaire ou l'activation de la cascade de coagulation 59

1.2.1. La voie intrinsèque de la coagulation, aussi nommée voie d'activation par contact 60

1.2.2. La voie extrinsèque de la coagulation, aussi nommée voie du facteur tissulaire 60
1.2.3. Convergence des deux voies de la coagulation : la voie commune 60
1.3. L'étape complémentaire de l'hémostase : la fibrinolyse 63
2. La coagulation et l'inflammation sont intimement liées 64
2.1. L'association de ces deux systèmes au cours de l'évolution 64
2.2. Limitation des infections et production de cytokines inflammatoires 65
2.2.1. Le phénomène de vasodilatation induit par la coagulation 65
2.2.2. Le phénomène de vasodilatation induit par les cytokines inflammatoires 68
2.3. Régulation de l'interaction coagulation-inflammation *via* l'inhibition de la thrombine ou du FT 69
2.3.1. L'anti-thrombine 69
2.3.2. Le TFPI 69
2.3.3. Les CRP 69
2.4. Lien entre coagulation et immunité 70
3. Le tPA, l'enzyme clef de la fibrinolyse 72
3.1. Le tPA et son histoire 72
3.2. La structure du tPA lui confère diverses fonctions 72
3.3. La synthèse du tPA assurée par différentes sources cellulaires 75
3.3.1. Le tPA exprimé dans la circulation sanguine 75
3.3.2. Le tPA exprimé dans le SNC 75
3.3.3. Le tPA exprimé dans de multiples organes 76
3.4. Action protéolytique du tPA : l'activation de la plasmine 76
3.4.1. Relation entre fibrinolyse et inflammation : la place de la plasmine 77
3.4.1.1. Rôle de la plasmine dans la production de cytokines pro-inflammatoires 77
3.4.1.2. Différentes maladies inflammatoires impliquant la plasmine 80
3.5. Le mode d'action non protéolytique du tPA : effet « cytokine-*like » via* des récepteurs spécifiques 82
3.5.1. *Via* les récepteurs LRPs 82
3.5.2. *Via* les récepteurs NMDA 83
3.5.3. *Via* l'annexine II ou les récepteurs à l'EGF 83
3.6. La régulation du tPA dans l'organisme 84
3.6.1. Le TAFI 84
3.6.2. Les PAI 84
3.6.3. La PN-1 84
3.7. Exemples d'implication du tPA dans l'inflammation 85
3.7.1. tPA et infections 85
3.7.2. La neuroinflammation 86
3.7.3. Les maladies rénales chroniques 86
III. RÔLES DU TPA DANS LA RÉPONSE IMMUNITAIRE 88

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS 97

RÉSULTATS 101

DISCUSSION 135

1. Phénotype des macrophages spléniques après traitement au LPS 139
2. Implication du tPA dans la différenciation des macrophages M1/M2 140
3. Modulation de la répartition des DCs par le LPS et le tPA 141
4. Implication du tPA dans l'activation lymphocytaire T après traitement au LPS 144
5. Limites et perspectives 144

CONCLUSION 147

AUTRES TRAVAUX 151

BIBLIOGRAPHIE 219

Index des figures

Figure 1 : L'hématopoïèse. 4
Figure 2 : Activation d'une cellule de l'immunité innée via l'engagement des PRRs. 6
Figure 3 : Transduction du signal TLR-4, de la surface cellulaire aux endosomes et phagosomes. 8
Figure 4 : Ontogénie et maintien des macrophages. 11
Figure 5 : Les macrophages résidents et les macrophages dérivés de monocytes jouent des rôles distincts dans les dommages tissulaires et la réparation des tissus. 15
Figure 6 : L'implication du système immunitaire dans l'inflammation aiguë : de l'initiation à la résolution. 21
Figure 7 : Processus tissulaires de cicatrisation dans l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. 23
Figure 8 : Processus cellulaires de cicatrisation cutanée. De l'inflammation aiguë à l'inflammation chronique. 24
Figure 9 : Le phénomène de polarisation des macrophages. 26
Figure 10 : Voies classiques de présentation des antigènes par les MHCII et MHCI. 29
Figure 11 : Représentation simplifiée du métabolisme de l'arginine. 33
Figure 12 : Représentation schématique des macrophages polarisés M1 et M2. 37
Figure 13 : Représentation simplifiée de l'origine, la distribution et la migration des sous-types de DCs murines. 46
Figure 14 : La synapse immunologique, site d'activation des lymphocytes T. 49
Figure 15 : Vue globale des principaux sous-ensembles de DCs. 54
Figure 16 : Illustration du concept de DCs immunogènes versus tolérogènes. 55
Figure 17 : Nomenclature revisitée du MPS. 57
Figure 18 : Représentation schématique de l'hémostase lors d'une lésion vasculaire, avec ses trois étapes interdépendantes. 58
Figure 19 : Activation de l'hémostase secondaire ou cascade de coagulation. 62
Figure 20 : Illustration des divers rôles de la thrombine impliqués dans la relation coagulation-inflammation. 67
Figure 21 : La stimulation de l'endothélium favorise l'inflammation. 68
Figure 22 : Représentation schématique de l'interaction entre les systèmes d'hémostase et d'inflammation. 71
Figure 23 : Structure du tPA lui attribuant diverses fonctions. 74
Figure 24 : Rôles multiples de la plasmine dans l'inflammation. 79
Figure 25 : Fonctions pléiotropes de la plasmine. 82
Figure 26 : Régulation de la fibrinolyse. 85
Figure 27 : Effets pro- ou anti-inflammatoires médiés par le tPA via son interaction avec ses différents récepteurs à la surface de macrophages. 137
Figure 28 : Étude de l'impact de la délétion du tPA sur le phénotype des cellules de l'immunité adaptative, après immunisation par la KLH. 143

Liste des abréviations

ADP : *adénosine diphosphate*

APC : *antigen-presenting cell*

Arg-1 : arginase 1

AVC : accident vasculaire cérébral

BATF3 : *basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3*

BCG : bacille de Calmette-Guérin

BHE : barrière hémato-encéphalique

BMDM : *bone marrow-derived macrophage*

BST2 : *bone marrow stromal cell antigen 2*

CADM1 : *cell adhesion molecule 1*

CCL : *chemokine CC motif ligand*

cDC : *conventional dendritic cell*

CIITA : *class II transactivator*

Clec9a : *C-type lectin receptor 9a*

CLR : *C-type lectin receptor*

CpG : cytosine-phosphate-guanine

CRP : *C-reactive proteins*

CTLA-4 : *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*

CXCL : *chemokine CXC motif ligand*

DAMP : *damage-associated molecular pattern*

DC : *dendritic cell*

EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

ECRP : *endothelial receptor of C-reactive proteins*

EGF : *epidermal growth factor*

Egr2 : *early growth response gene 2*

eNOS : *endothelial nitric oxyde synthase*

ESAM : *endothelial cell-specific adhesion molecule*

Flt3L : *Feline McDonough Sarcoma (FMS)-like tyrosine kinase 3 ligand*

FT : facteur tissulaire

G-CSF : *granulocyte colony-stimulating factor*

GM-CSF : *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*

GM-CSFR : *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor receptor*

HLA : *human leukocyte antigen*

HSC : *hematopoietic stem cell*

ICAM : *intercellular adhesion molecule*

ID2 : *inhibitor of DNA binding 2*

IDO : *indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*

IFN : interféron

IGF-1 : *insulin-like growth factor I*

IHC : immunohistochimie

IL : interleukine

IL-1R : récepteur à l'interleukine 1

iNOS : *inducible nitric oxide synthase*

IRF8 : *interferon regulatory factor 8*

KLH : *keyhole limpet haemocyanin*

LB : lymphocyte B

LBS : *lysine binding site*

LC : *Langerhans cell*

LPM : *large peritoneal macrophage*

LPS : lipopolysaccharide

LRP : l*ow density lipoprotein receptor-related protein*

LT : lymphocyte T

LTreg : lymphocytes T régulateur

mAb : *monoclonal antibody*

Mac-1 : *macrophage-1 antigen*

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein 1*

M-CSF : *macrophage colony-stimulating factor*

MEC : matrice extracellulaire

MFI : *median fluorescence intensity*

MHC : *major histocompatibility complex*

MMP : *matrix metalloproteinase*

MoDC : *myeloïd-derived dendritic cell*

MPP : *multipotent progenitor*

MPS : *mononuclear phagocyte system*

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Necl2 : *Nectin-like 2*

NFAT5 : *nuclear factor of activated T cells 5*

NF-κB : *nuclear factor-kappa B*

NK : *natural killer cell*

NLR : *NOD-like receptor (NOD: nucleotide oligomerization domain)*

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

nNOS : *neuronal nitric oxyde synthase*

NO : *nitric oxide*

NOS : *nitric oxyde synthase*

OLS : organe lymphoïde secondaire

OUU : obstruction unilatérale d'uretère

PAI : *plasminogen-activator inhibitors*

PAMP : *pathogen associated molecular pattern*

PAR : *protease-activated receptors*

pDC : *plasmacytoid dendritic cell*

PD-L1 : *programmed death-ligand 1*

PGDF : *platelet-derived growth factor*

PGI_2 : prostacycline

PRR : *pattern recognition receptor*

RLR : *RIG-I-like receptors (RIG: retinoic acid-inducible gene)*

ROS : *reactive oxygen species*

SAM : syndrome d'activation macrophagique

SCID : *severe combined immunodeficiency*

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

SiglecH : *sialic acid binding Ig-like lectinH*

SNC : système nerveux central

SPM : *small peritoneal macrophage*

TAFI : *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*

TAM : *tumor associated macrophage*

TCR : *T-cell receptor*

TFPI : *tissue factor pathway inhibitor*

TGF-β : *transforming growth factor β*

Th : *T helper cell*

TIR : *Toll-interleukin 1 receptor domain*

TLR : Toll-*like receptor*

TNF : *tumor necrosis factor*

tPA : *tissue-type plasminogen activator*

TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

uPA : *urokinase-type plasminogen activator*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

vWF : von Willebrand

WPB : *Weibel-Palade body*

WT : *wild-type*

XCR1 : X*C motif chemokine receptor 1*

Avant-propos

Cette thèse a été réalisée sous la direction du Docteur Olivier Toutirais et du Professeur Brigitte Le Mauff, au sein de l'unité INSERM U1237 « *Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders* » (PhIND), au GIP Cyceron (Caen, France).

La thématique de notre unité de recherche est axée sur l'étude des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Dans ce contexte, notre laboratoire étudie particulièrement l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), une sérine-protéase connue pour sa fonction fibrinolytique. Le tPA est exprimé par diverses sources cellulaires, mais il est synthétisé de manière plus importante par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Il permet la conversion du plasminogène en plasmine, l'enzyme active capable de dégrader la fibrine contenue dans les thrombi, à l'origine des AVC ischémiques.

Le tPA a surtout été étudié à travers son domaine protéolytique, pour sa fonction dans la fibrinolyse. Cependant, celui-ci possède différents domaines fonctionnels lui conférant d'autres propriétés, notamment, celle de réguler l'inflammation grâce à son interaction avec des récepteurs spécifiques. Par exemple, notre équipe a démontré que le tPA était capable de se fixer sur le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA), *via* son domaine *Kringle 2* et de médier l'inflammation dans un modèle murin de sclérose en plaques, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (Nicole *et al.*, 2001; Macrez *et al.*, 2016).

Notre objectif a été de mieux caractériser le rôle du tPA dans l'inflammation en utilisant des animaux $tPA^{-/-}$ et en étudiant la répartition et le phénotype de différentes populations cellulaires de l'immunité innée, après l'induction d'une inflammation aiguë.

Aparté

Ce projet de recherche a émergé en cours de thèse et a débuté de façon effective à compter de juin 2020. Le sujet initial de thèse était différent et portait sur l'analyse de la réponse lymphocytaire T dirigée contre le récepteur NMDA dans le contexte de l'encéphalite auto-immune à anticorps anti-récepteur NMDA. Cependant, pour diverses raisons techniques et pratiques, nous avons dû réorienter le projet de thèse vers l'étude de l'implication du tPA dans la réponse immunitaire, qui était initiallement un projet annexe de recherche, débuté au printemps 2020.

INTRODUCTION

I. Le système immunitaire

1. Généralités

L'**immunité** constitue un état de protection d'un organisme vis-à-vis d'un pathogène étranger. Elle résulte de la mise en place de mécanismes qui ont évolué phylogénétiquement afin d'aboutir à des systèmes capables de lutter contre des infections. L'ensemble de nos tissus est ainsi composé de cellules et de molécules qui œuvrent à la mise en place de cette immunité et constituent notre **système immunitaire**. Cet ensemble intègre correspond aux interactions nombreuses et complexes qui aboutissent normalement à la protection contre les agents infectieux : la **réponse immunitaire**. En ce sens, cela confère à notre système immunitaire sa fonction majeure qui est de lutter contre les pathogènes pour rétablir l'équilibre entre diverses caractéristiques physiologiques, appelé homéostasie (Riera Romo, Pérez-Martínez and Castillo Ferrer, 2016).

Il est commun de parler du système immunitaire alors que deux types d'immunité le constituent. Avec d'une part, l'**immunité innée**, ancestrale et héritée naturellement chez toute espèce vivante ; et d'autre part, l'**immunité adaptative**, ayant évoluée vers la forme actuelle chez les vertébrés à mâchoire (les gnathostomes).

De la mise en place de l'immunité innée, découle le déclenchement de l'immunité adaptative. En effet, la première s'instaure rapidement et n'est pas spécifique d'un pathogène, tandis que la seconde met plus de temps à s'engager car elle implique de multiples étapes et l'initiation de réponses spécifiques d'un agent infectieux. De plus, cette dernière permet la génération d'une mémoire immunologique de longue durée, dont les gnathostomes tirent nettement avantage (Netea *et al.*, 2019).

2. L'immunité innée

L'immunité innée représente la première ligne de défense d'un organisme envers un agent infectieux. Son but premier est de prévenir, contrôler et éliminer la menace. C'est donc un processus qui répond à des besoins primaires et qui s'installe très rapidement, dès le début de l'agression et jusqu'à quelques heures après. C'est la phase de réponse inflammatoire ou d'**inflammation**. Ses trois principales fonctions sont :

- L'élimination des pathogènes,
- La détersion du tissu endommagé, et
- L'initiation de la réparation tissulaire.

C'est un processus qui aboutit à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et qui engendre la production de chimiokines permettant de recruter davantage de cellules immunitaires au site d'infection. Ce processus aboutit à l'apparition des cinq signes cliniques principaux de l'inflammation : rougeur, chaleur, gonflement, douleur et perte de fonction (Hoffmann and Akira, 2013; Germolec *et al.*, 2018).

2.1. Les barrières physico-chimiques de l'immunité innée

Les composants de l'immunité innée sont de multiples natures. Les premiers d'entre eux sont une barrière physique : les épithéliums. Les cellules épithéliales les constituant sont présentes au niveau de la peau où elles forment l'épiderme, épithéliums respiratoires, gastro-intestinaux, urinaires et reproducteurs. Elles tapissent ainsi la paroi de nos organes creux et sont de divers types en fonction de la structure, localisation, ainsi que des besoins et fonctions de ces organes. C'est d'ailleurs pourquoi la plupart des cellules épithéliales sont polarisées. En effet, elles sont de réelles interfaces entre les milieux interne et externe de notre organisme. Par exemple, les cellules épithéliales qui tapissent les organes respiratoires sont ciliées et vibratiles, tandis que celles qui revêtent les organes digestifs comportent des microvillosités. Cela confère à ces deux épithéliums des propriétés particulières et importantes qui sont, respectivement, le mouvement du mucus présent dans les voies aériennes, ou, la permsélectivité et l'optimisation des surfaces d'échange facilitant l'assimilation des nutriments. À ces barrières physiques, s'ajoutent des barrières chimiques, *via* la sécrétion par les cellules épithéliales, de lysozymes et/ou de peptides antimicrobiens (Riera Romo, Pérez-Martínez and Castillo Ferrer, 2016; Kaur and Secord, 2019). Concernant le mucus présent dans l'épithélium respiratoire, celui-ci possède une capacité mécanique à éliminer les agents infectieux piégés dans sa matrice, mais il est également imprégné de lysozyme qui possède un pouvoir opsonisant ainsi qu'une fonction enzymatique lui conférant la possibilité de lyser ces mêmes agents infectieux (Girod *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 2020). Les peptides antimicrobiens, quant à eux, peuvent être produits par les cellules épithéliales de la peau, permettant de lutter contre des infections, notamment secondaires à d'éventuelles lésions (Herman and Herman, 2019). Les cellules épithéliales qui revêtent l'intestin grêle, les cellules de

Paneth, localisées au fond des cryptes intestinales, sécrètent également des peptides antimicrobiens en grande quantité, comme des défensines ou des lysozymes. En effet, la face apicale de ces cellules tapisse la lumière du système digestif qui est en contact permanent avec des germes commensaux, et d'autres, pouvant être pathogènes. C'est donc en partie grâce à la libération de peptides antimicrobiens protecteurs que cet épithélium est rendu tolérogène et peu réactif aux agents étrangers (Riera Romo, Pérez-Martínez and Castillo Ferrer, 2016).

2.2. Les acteurs cellulaires et moléculaires de l'immunité innée

La réponse immunitaire innée est également assurée par des cellules d'origine hématopoïétique, comprenant des cellules phagocytaires résidentes, comme le sont les mastocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DCs) par exemple ; mais aussi, comprenant la classe des granulocytes : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Enfin, les monocytes, précurseurs des macrophages sont également impliqués dans l'initiation de l'immunité innée (Kratofil, Kubes and Deniset, 2017).

L'ensemble de ces cellules proviennent de la lignée myéloïde, issues d'un progéniteur myéloïde commun, répondant à des facteurs de croissance comme le G(M)-CSF (*granulocyte-(monocyte) colony-stimulating factor*) et des cytokines, comme les interleukines 1 (IL-1), IL-3 et IL-6, agissant sur leur différenciation. Cependant, une exception existe concernant les DCs. En effet, ces cellules émergent d'un progéniteur dendritique commun ; mais celui-ci peut à la fois être issu d'un précurseur myéloïde ou lymphoïde (Puhr *et al.*, 2015). Cette distinction de genèse cellulaire dans l'hématopoïèse donne naissance à deux catégories de DCs qui sont : les DCs conventionnels (cDCs), encore non différenciées à ce stade, et les DCs plasmacytoïdes (pDCs) (Eisenbarth, 2019) (**Figure 1**). Les cellules *natural killer* (NK) quant à elles, également engagées dans les réponses immunitaires innées, sont issues de la lignée lymphoïde, émanant donc d'un progéniteur lymphoïde commun. Elles réagissent à d'autres facteurs de croissance et cytokines comme le facteur de nécrose tumorale (TNF), les interférons α/β (IFN) et les IL-12 et IL-15 (Di Santo, 2006).

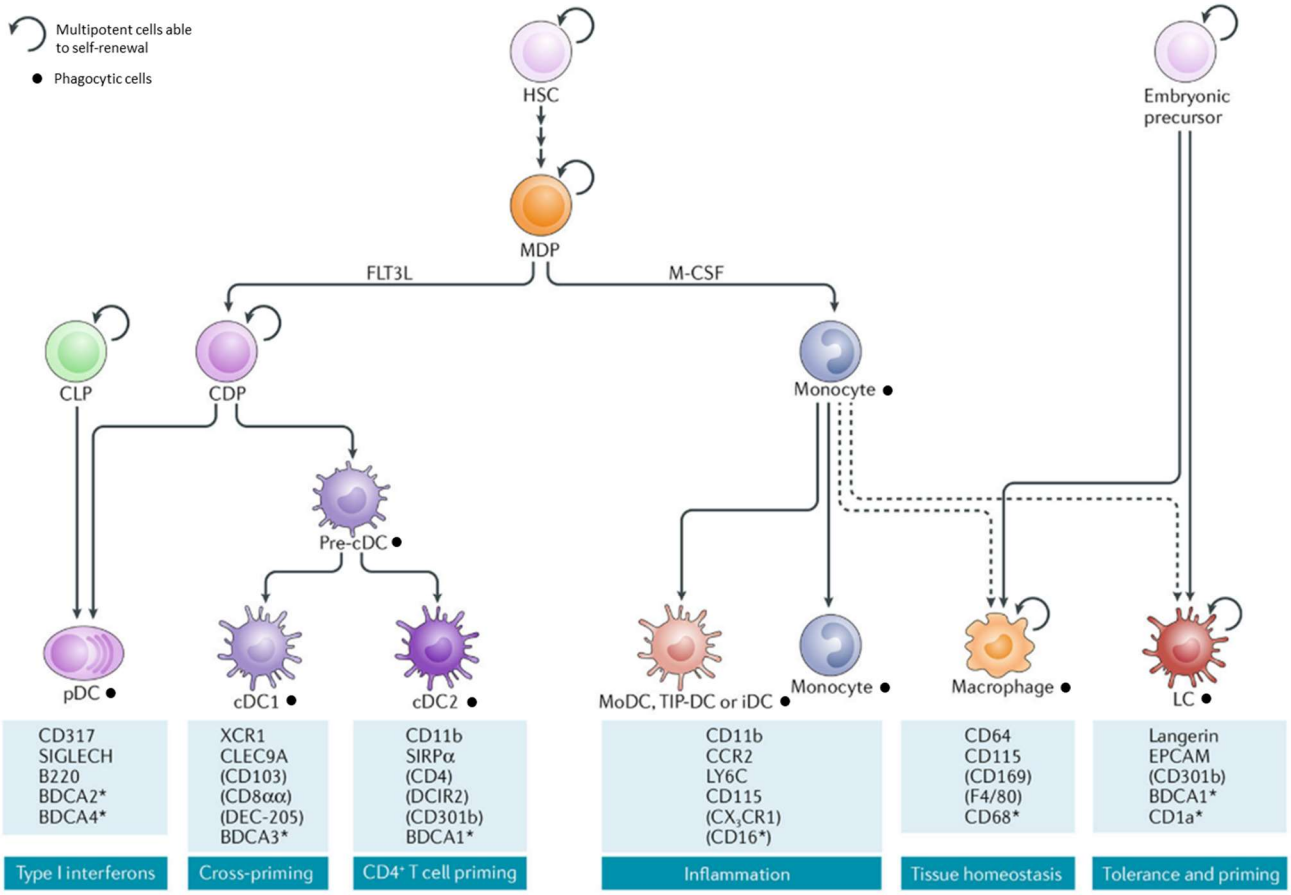


Figure 1 : L'hématopoïèse.

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont des progéniteurs multipotents, capables de générer un progéniteur macrophages-DCs (MDP). En fonction des cytokines présentes dans l'environnement cellulaire (FLT3L ou M-CSF), le MDP donne lieu aux lignées myéloïdes (monocytes) et lymphoïdes (CDP). Les cellules myéloïdes proviennent du MDP dont la différenciation donne lieu à de nombreux types cellulaires comme les macrophages. La lignée lymphoïde est à l'origine d'autres types cellulaires comme les cDCs. FLT3L : FMS-like tyrosine kinase 3 ligand ; M-CSF : macrophage colony-stimulating factor ; CLP : common lymphoïd progenitor ; cDC : conventional dendritic cell ; pDC : plasmacytoïd dendritic cell ; MoDC : macrophage-derived dendritic cells ; TIP-DC : TNF/iNOS-dendritic cell ; iDC : inflammatory dendritic cell ; LC : Langerhans cell (figure adaptée à partir de Eisenbarth et al., 2019).

Parmi tous ces leucocytes, les phagocytes constituent un type cellulaire particulièrement important dans la réponse immunitaire innée. Ils ont en effet la capacité de reconnaître et éliminer des éléments microbiens grâce à des déterminants hautement conservés, *via* la reconnaissance à la surface de ceux-ci de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) (Hoffmann and Akira, 2013). Les PAMPs sont portés par des pathogènes étrangers à l'organisme qui peuvent, par exemple, être des constituants de la membrane plasmique de certaines bactéries. Par ailleurs, les phagocytes sont également en mesure de reconnaître des signaux de danger appelés motifs moléculaires associés au danger (DAMPs). Il a été identifié que les DAMPs sont principalement portés par des cellules altérées, après un stress tissulaire comme peut l'être une pression

mécanique trop forte par exemple. L'inflammation médiée par la présence de DAMPs est nommée « stérile » car elle n'est provoquée que par la détection d'agents dépourvus de germes (Zindel and Kubes, 2020). Ces deux catégories de molécules sont reconnues par les phagocytes grâce aux récepteurs de reconnaissance spécifique de ces motifs moléculaires : les PRRs (*pattern recognition receptors*). Les PRRs sont présents en surface et/ou à l'intérieur des cellules phagocytaires, et sont aussi présents au niveau des cellules épithéliales (Schroder and Tschopp, 2010). Parce qu'il existe une multitude de particules microbiennes, divers types de PRRs sont nécessaires. Également, en fonction du pathogène présent, différents PRRs peuvent être recrutés et conditionner, du moins en partie, la nature de la réponse immunitaire générée.

Les PRRs existent sous forme soluble ou bien associés aux cellules. Les PRRs solubles jouent un rôle majeur dans l'activation du système du complément. Ils sont activés par des agents infectieux circulants ou en réponse à des stimuli cytokiniques. Parmi les PRRs solubles, ceux faisant partie des plus décrits sont les protéines C réactives (CRPs), de la famille des pentraxines (Hoffmann and Akira, 2013; Smole, Kratzer and Pickl, 2020). Lorsque le système du complément est activé, il fonctionne en cascade. Une partie des protéines qui le constituent sont des protéases dont les propriétés enzymatiques s'activent entre elles par clivage. L'ensemble des voies constituant le système du complément, permet l'opsonisation, le chimiotactisme et la lyse des agents infectieux et exerce ainsi des fonctions complémentaires à celles des acteurs cellulaires de l'immunité innée (Hoffmann and Akira, 2013; Lubbers *et al.*, 2017). C'est aussi un élément important dans l'amplification de l'inflammation.

Les PRRs associés aux cellules sont divisés en deux familles sur la base de leurs fonctions premières (**Figure 2**) :

- Les **récepteurs d'endocytose**, exclusivement membranaires, parmi lesquels se trouvent les récepteurs de type lectine-C-*like* (CLRs) et les récepteurs *scavengers* comme l'est la molécule transmembranaire CD68 par exemple, présente à la surface des macrophages et cellules dendritiques.
- Les **récepteurs de signalisation**, comptent les Toll-*like* récepteurs (TLRs), récepteurs transmembranaires présents à la membrane plasmique mais également au niveau des membranes endosomales ; mais aussi les récepteurs intracytoplasmiques, comme les récepteurs de type NOD-*like* (NLRs) et les récepteurs de type RIG-I-*like* (RLRs). Les NLRs reconnaissent des composants bactériens et les RLRs des composants viraux (Jeannin,

Jaillon and Delneste, 2010; Hoffmann and Akira, 2013). Une des particularités des NLRs est d'induire la formation d'inflammasomes qui sont des complexes multiprotéiques formés par l'oligomérisation des NLRs avec leurs ligands en association avec des protéines cytoplasmiques.

La détection de PAMPs ou de DAMPs par les PRRs induit l'activation de la cellule (**Figure 2**) :

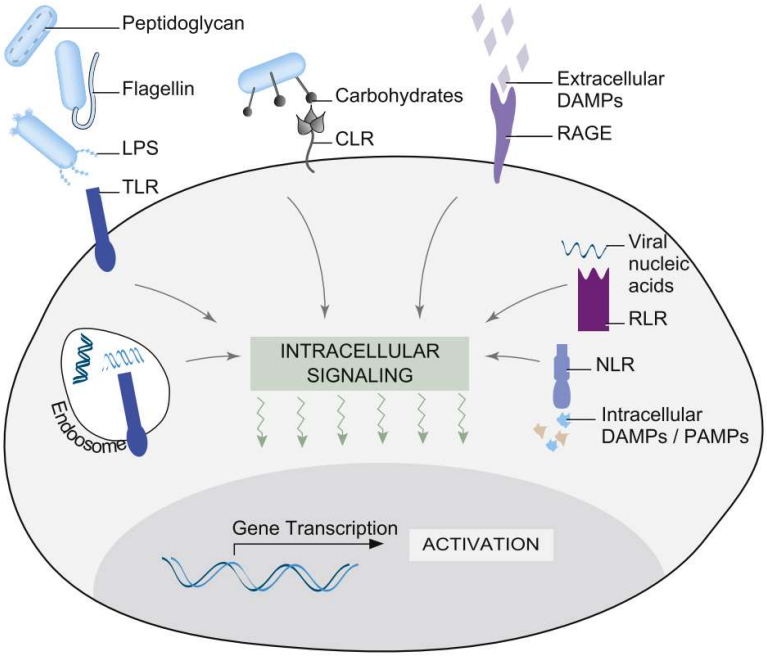


Figure 2 : Activation d'une cellule de l'immunité innée via l'engagement des PRRs.
Représentation schématique d'une cellule (telle qu'une DC, un macrophage ou un neutrophile) qui peut rencontrer divers PAMPs et DAMPs engageant des PRRs. Les PAMPs dérivés de flagelles bactériens, du LPS ou de peptidoglycanes engagent les TLRs positionnés au niveau de la membrane plasmique de la cellule, tandis que les glucides bactériens extracellulaires engagent les CLRs. Les DAMPs extracellulaires produits par l'hôte stimulent la cellule en engageant les récepteurs RAGE. La cellule peut phagocyter un agent pathogène, induisant sa digestion et la présence de ses acides nucléiques dans un compartiment endosomal exprimant les TLRs endosomaux. Si l'agent pathogène est un virus, les RLRs cytosoliques peuvent se lier aux acides nucléiques viraux pendant la réplication. Les autres PAMPs et les DAMPs intracellulaires présents dans le cytosol sont reconnus par les NLRs. Le résultat final de l'engagement de tout ou une partie de ces PRRs est une signalisation intracellulaire qui conduit à l'activation de facteurs de transcription nucléaire, comme le NF-κB, à la transcription du gène et à l'activation de la cellule (Hoffmann & Akira., 2013).

S'en suit alors la production de médiateurs pro-inflammatoires ayant pour but d'éliminer les particules du « non soi » ou du « soi altéré ». Les cellules produisent ainsi des radicaux libres (ROS), des peptides antimicrobiens, des chimiokines impliquées dans le recrutement cellulaire et des cytokines impliquées dans la différenciation cellulaire. Une des voies de signalisation amenant à la production de médiateurs de l'immunité est celle du facteur de transcription nucléaire-κB (NF-κB). L'IκB, inhibiteur du NF-κB, maintient le facteur de transcription inactif dans le cytoplasme

jusqu'à ce qu'une signalisation intracellulaire induise sa dégradation. Libéré de l'IκB dégradé, en réponse à l'engagement d'un TLR par exemple, le NF-κB est transloqué dans le noyau du leucocyte et induit la transcription de gènes de cytokines (Hoffmann and Akira, 2013).

Les senseurs que sont les PRRs, font ainsi des épithéliums et des phagocytes les premières entités impliquées dans l'entrave et l'élimination des pathogènes ; constituant ainsi les « premières lignes de défense de l'organisme » (Vijay, 2018).

Parmi les différents PRRs, les TLRs ont été les premiers à être identifiés et sont les plus étudiés (Kawasaki and Kawai, 2014). Ceux-ci sont essentiellement définis par un domaine extracellulaire riche en répétition de leucines, assurant la reconnaissance des PAMPs, ainsi que par un domaine transmembranaire lié aux domaines cytosoliques de type Toll, accompagnés d'un récepteur homologue au domaine de signalisation à l'IL-1 (IL-1R). L'association Toll/IL-1R requise pour les voies de signalisation en aval constitue le domaine TIR (Medzhitov, Preston-Hurlburt and Janeway, 1997; Rich, Allen and Trowsdale, 2000; Wasserman, 2000; Fallon, Allen and Rich, 2001). La signalisation Toll est présente de la vie primitive, représentée par le nématode, à la forme de vie la plus avancée, les mammifères. À ce jour, dix TLRs fonctionnels ont été identifiés chez l'Homme et treize chez la souris (Fallon, Allen and Rich, 2001; Kawai and Akira, 2011). Leur rôle central dans les réponses anti-infectieuses est confirmé par l'impact des nombreux polymorphismes sur la réponse immune innée et l'inflammation (Kaur and Secord, 2019; Mukherjee, Huda and Sinha Babu, 2019).

Parmi les TLRs, le TLR-4 est particulièrement intéressant pour son rôle dans la réponse au lipopolysaccharide (LPS) chez l'Homme et la souris (Medzhitov and Janeway, 1997; Poltorak *et al.*, 1998; Beutler, 2000). Cette découverte a révolutionné la vision de la biologie de la réponse immunitaire chez les mammifères car elle a permis d'identifier une composante majeure du système immunitaire, responsable de la reconnaissance des agents pathogènes potentiels, de la réponse immunitaire innée et de la régulation de la réponse immunitaire adaptative (Vijay, 2018).

Le LPS est un composant de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, nécessaire à leur survie et par conséquent, très conservé. Il est un puissant activateur de la réponse immunitaire innée, fréquemment utilisé dans les modèles animaux d'inflammation aiguë (Kaur and Secord, 2019). Le LPS soluble est reconnu par le TLR-4, associé, entre autres, au CD14. Cet évènement active la protéine intracellulaire de différenciation myéloïde MyD88, induisant la translocation du

NF-κB, et la production de cytokines, telles que le TNF (**Figure 3**). Tandis que la production d'IFN-β nécessite une seconde voie de signalisation intracellulaire dépendante de l'endocytose *via* la protéine TRIF. Lorsque le LPS présent à la membrane bactérienne d'*Escherichia coli* par exemple, il est détecté par un TLR-4, la phagocytose s'enclenche et active les mêmes voies de signalisation intracellulaire, complétée cependant par des signaux indépendants de CD14 (Underhill and Goodridge, 2012). La production de TNF et d'IFN-β, des cytokines pro-inflammatoires, acteurs moléculaires précieux de la réponse immunitaire innée, engendre une inflammation sollicitant les processus de prolifération et différenciation des cellules de l'immunité.

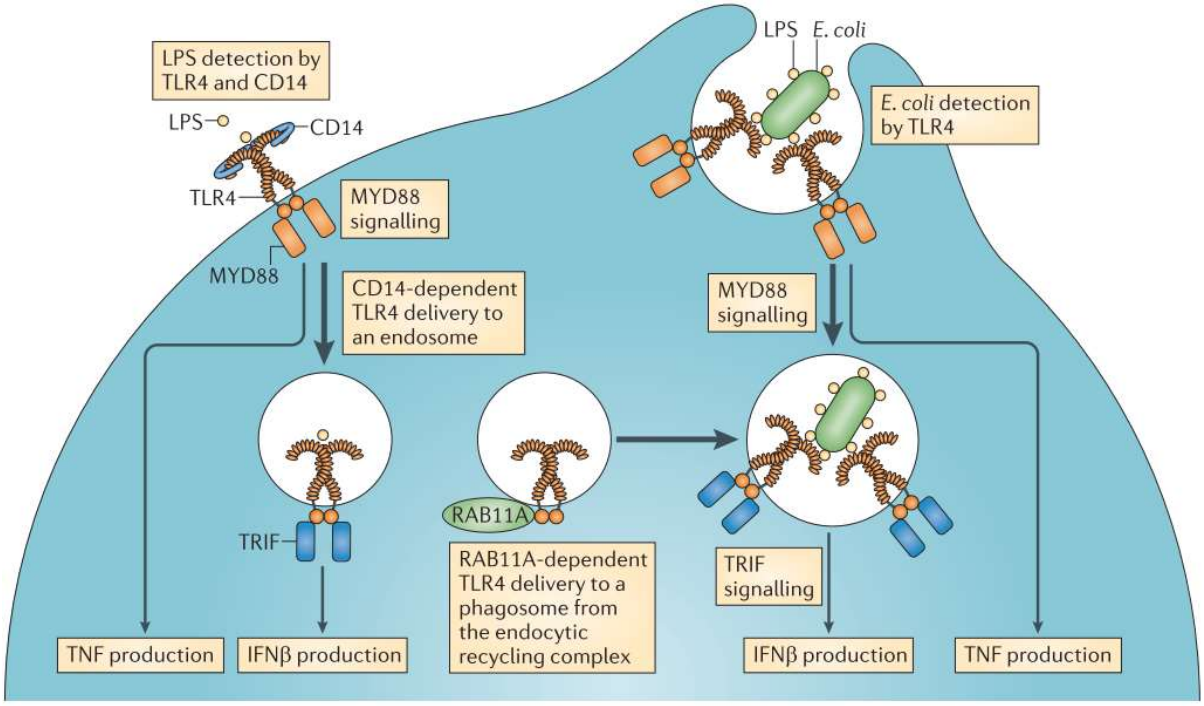


Figure 3 : Transduction du signal TLR-4, de la surface cellulaire aux endosomes et phagosomes.
Le TLR-4 membranaire signalise via la protéine MyD88 et sous sa forme endosomale via la protéine TRIF. Le recrutement de TLR-4 pour la signalisation médiée par TRIF est régulé de manière différentielle lorsque les cellules endocytent le LPS soluble ou lorsqu'elles phagocytent les bactéries contenant du LPS (Underhill & Goodridge., 2012).

Il est très intéressant de noter que, jusqu'à il y a quelques années, l'immunité innée semblait dépourvue de « mémoire ». C'est-à-dire, incapable, après une première infection avec un pathogène donné, de s'en « souvenir » lors de sa réinfection. Cette notion est aujourd'hui à revoir. En effet, chez les plantes et les invertébrés, qui ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif, il a été démontré qu'après un second contact avec un agent infectieux, ces organismes développent une forme de résistance (Kurtz, 2005). Le terme alors employé est celui de résistance systémique acquise, retrouvé ensuite dans de multiples études (Spoel and Dong, 2012; Reimer-

Michalski and Conrath, 2016). Dans un modèle murin d'infection par la levure *Candida albicans*, il a été démontré que lors d'une infection secondaire à une dose classiquement létale de ce pathogène, les animaux survivaient. Ces observations ont été associées à des modifications du profil épigénétique des monocytes et macrophages, supposées conférer aux animaux une résistance ou une mémoire de l'agression (Saeed *et al.*, 2014). De récentes études parlent désormais d'immunité « entraînée » concernant les cellules de l'immunité innée, qu'elles proviennent d'insectes ou de mammifères (Netea *et al.*, 2019). Donc, contrairement à la notion de mémoire immunitaire caractéristique de l'immunité adaptative, il est maintenant évident qu'une stimulation des cellules de l'immunité innée renforce leur réactivité.

En résumé, l'immunité innée est la voie activée par les particules microbiennes, reconnues dès leur intrusion dans l'organisme et qui s'accompagne de l'expression de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Cela entraîne un recrutement cellulaire important de neutrophiles et de macrophages impliqués dans l'élimination immédiate des agents pathogènes par phagocytose.

2.3. Les macrophages, d'excellents phagocytes

La phagocytose est un mécanisme clef de la réponse immunitaire innée. C'est le processus par lequel les cellules ingèrent une grande variété de cibles particulaires, y compris des microorganismes, des cellules mortes et des débris environnementaux. Ce phénomène de défense contre certains microorganismes intervient aussi en condition homéostatique et participe au remodelage tissulaire normal ainsi qu'au remodelage des tissus endommagés (Underhill and Goodridge, 2012). La fonction de phagocytose est partagée par les neutrophiles, les DCs, mais aussi et surtout par les macrophages.

2.3.1. Leur découverte par Élie Metchnikoff

La notion de phagocyte vient du grec ancien « *phago* » signifiant « manger » et de « *kutos* » signifiant « cellule, cavité ». Ce terme a été employé pour la première fois par Élie Metchnikoff en 1882, partant de l'observation qu'une cellule vivante et motile avait la capacité d'ingurgiter des éléments étrangers à son environnement. C'est à partir de cette découverte que Metchnikoff a nommé les premières cellules phagocytaires : « macrophages ». Il les a initialement décrites comme possédant un noyau de grande taille *a contrario* des cellules polymorphonucléaires qu'il a nommé « microphages » en référence à des cellules mononuclées

multilobées (Annales de l'Institut Pasteur, avril 1887., p. 199; Hirsch, 1959). Plus tard, il a démontré le rôle de ces phagocytes au sein des processus inflammatoires, alors nommés « résistance d'un hôte aux infections » et a reçu le Prix Nobel de médecine/physiologie en 1908 en récompense de ses découvertes (Hirsch, 1959).

2.3.2. Les origines tissulaires des macrophages

C'est au début du XXème siècle que les premières hypothèses concernant l'origine tissulaire des macrophages ont été formulées. Alexander Maximow a suggéré qu'il existait une cellule commune à l'origine de la genèse du système sanguin complet appelé « lymphocyte » ; ainsi qu'un réservoir de ces cellules au sein de la moelle osseuse (Maximow, 1909). Wera Dantschakoff partageait l'avis de son confrère tout en le nuançant. Elle rapportait l'idée qu'il existe d'autres types cellulaires que des lymphocytes ou des érythroblastes, ressemblant aux macrophages décrits de nos jours, à des stades précoces de l'ontogénie, soit, avant le début de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse (Dantschakoff, 1908). Cependant, il restait à identifier clairement leurs fonctions et les mécanismes sous-jacents.

Soixante ans plus tard, Ralph Van Furth et Zanvil A. Cohn proposent l'hypothèse d'un « *mononuclear phagocyte system* » (MPS), selon laquelle les macrophages proviendraient uniquement des monocytes circulants (van Furth and Cohn, 1968). Cette suggestion a rapidement été révisée grâce aux travaux menés *in vitro* et *in vivo* chez la souris par Malcolm Moore et Donald Metcalf, affirmant que les macrophages pouvaient également provenir de précurseurs embryologiques originaires de la vésicule vitelline (réserve de matière nutritive présente au début de la vie de certains organismes) (Moore and Metcalf, 1970). Cette étude a conduit Van Furth à démontrer qu'ils se différenciaient au cours de l'ontogénie, mais aussi dans la moelle osseuse, à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC), *via* l'intermédiaire des monocytes (Van Furth *et al.*, 1972). Ce sont Martin J. Cline et Malcolm Moore qui l'ont ensuite démontré *in vivo*, en ajoutant qu'avant d'atteindre leur stade de macrophages matures, ceux-ci se différencient *via* les stades promonocytaires et monocytaires (Cline and Moore, 1972).

Par conséquent, au moins deux sources différentes de macrophages ont été successivement proposées. Vingt années supplémentaires se sont écoulées avant d'identifier un troisième tissu dont les macrophages seraient originaires : le foie fœtal. En effet, Ana Cumano y a identifié un progéniteur myéloïde, distinct des progéniteurs lymphoïdes, tandis que jusqu'alors les

scientifiques pensaient que toutes les cellules de l'immunité provenaient de précurseurs hématopoïétiques identiques (Cumano *et al.*, 1992).

Ce siècle de recherches sur le sujet a engendré une évolution conceptuelle dans notre compréhension du développement des macrophages. Il est maintenant établi que trois sources distinctes de précurseurs de macrophages apparaissent au cours du développement (Ginhoux and Jung, 2014; Hoeffel et al., 2015). La première provient de progéniteurs érythro-myéloïdes précoces du sac vitellin, qui donnent des macrophages tissulaires sans intermédiaire monocytaire à l'âge embryonnaire E8,5 à 9 chez la souris. La deuxième est issue du foie fœtal, à partir de progéniteurs érythro-myéloïdes dérivés du sac vitellin tardif dès E12,5 jusqu'à E15. La troisième source provient des cellules souches hématopoïétiques qui colonisent la moelle osseuse à partir de E17,5 et produisent les monocytes présents dans le sang en continu tout au long de la vie (Williams et al., 2018) (Figure 4).

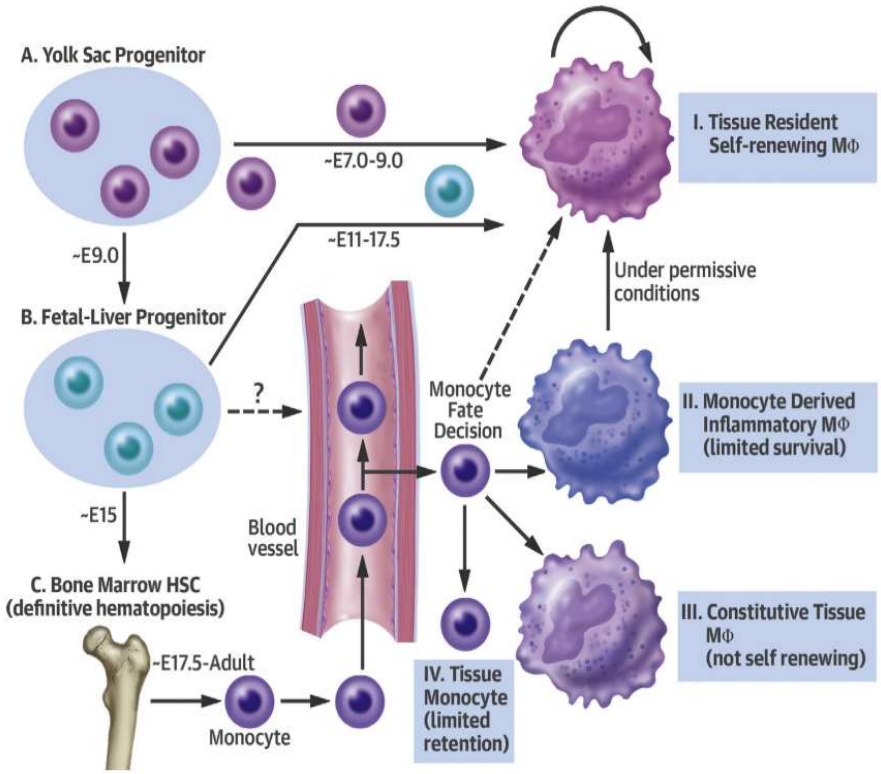


Figure 4 : Ontogénie et maintien des macrophages.
*Les progéniteurs de macrophages apparaissent dans les tissus au cours et après l'embryogenèse, suivant trois étapes et sources distinctes : **A)** d'abord sans le sac vitellin, **B)** puis dans le foie fœtal et enfin, **C)** dans la moelle osseuse. À chaque stade peuvent être générées des populations de macrophages résidant dans les tissus. À partir de ces trois sources, trois types de macrophages ont été décrits : (I) les macrophages résidents des tissus provenant du sac vitellin ou du foie fœtal, (II) les macrophages inflammatoires dérivés de monocytes provenant de la moelle osseuse, enfin (III) les macrophages tissulaires constitutifs dérivant exclusivement de monocytes issus de la moelle osseuse (Williams et al., 2018).*

Il s'avère que les macrophages issus du sac vitellin ou du foie fœtal deviennent des macrophages résidents, capables d'auto-renouvellement. Ils constituent la principale population de macrophages trouvée dans les tissus, où ils sont des cellules sentinelles. Ils proviennent des macrophages tissulaires fœtaux qui persisteront et maintiendront le *pool* de macrophages résidents jusqu'à l'âge adulte, sans être remplacés par des cellules dérivées de la moelle osseuse ou des monocytes sanguins adultes. (Ginhoux and Jung, 2014; Moraes-Pinto, Suano-Souza and Aranda, 2021). En revanche, les macrophages inflammatoires, lorsqu'ils sont recrutés au site d'infection, se différencient à partir de monocytes sanguins issus de la moelle osseuse (Williams *et al.*, 2018). Suivant leur environnement tissulaire et cellulaire, ainsi que des signaux perçus, les macrophages acquièrent des phénotypes et fonctions différentes.

2.3.3. Le phénotype des macrophages, clef de leur identification

C'est par l'expression du **CD11b** (antigène M1/70) en surface des macrophages que Thimothy A. Springer pensait identifier, en 1979, le premier antigène de différenciation spécifique des phagocytes (Springer *et al.*, 1979). Le CD11b, ou chaîne αM, constitue avec le CD18, une molécule de la famille des intégrines β2, l'antigène de macrophages 1 : Mac-1. Mac-1 est aussi connu sous le nom de récepteur 3 du complément (CR3), pour sa liaison avec la protéase inactive iC3b, qui permet l'opsonisation et favorise la phagocytose des bactéries ayant activé le complément (Tanaka, 2016). Mac-1 peut aussi lier d'autres ligands, tels que la molécule d'adhérence intercellulaire 1 (ICAM-1), ICAM-2, ou le fibrinogène, un facteur de coagulation. Ces ligands permettent notamment au CD11b son implication dans les phénomènes d'adhérence cellulaire à endothélium et de migration leucocytaire en conditions inflammatoires. Mac-1 est normalement exprimé sous une forme inactive, mais est rapidement activé par des chimiokines en cas d'inflammation pour assurer l'adhérence ferme aux cellules endothéliales avant de leur permettre d'infiltrer les tissus lésés.

L'expression cellulaire du CD11b a été étudiée *in vitro*. Il a été observé qu'elle varie en fonction de la localisation tissulaire et de la différenciation des macrophages. Par exemple, il a été rapporté que son expression était augmentée sur les macrophages péritonéaux et hépatiques (cellules de Kupffer) par rapport aux macrophages spléniques (Movita *et al.*, 2012). Le niveau d'expression de CD11b varie aussi en fonction de l'état d'activation des cellules. Il est exprimé à de faibles niveaux, voire est indétectable, au niveau des précurseurs myéloïdes, mais atteint des niveaux d'expression

élevés en surface des neutrophiles, monocytes et macrophages matures. Lorsque ces cellules s'activent, le CD11b voit son expression augmenter (Dziennis *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 2017). À ce jour, le CD11b n'est pas considéré comme marqueur exclusif des phagocytes ou des macrophages, car cette molécule a aussi été montrée comme exprimée par de nombreux autres types de leucocytes, tels que les DCs conventionnelles de type 2 (cDC2), les NK, les monocytes, granulocytes, les lymphocytes activés ou par la microglie dans le cerveau (Guilliams *et al.*, 2014; Durai and Murphy, 2016; Tanaka, 2016).

En 1981, Jonathan M Austyn et Siamon Gordon identifient une glycoprotéine portée à la membrane de macrophages murins : le **F4/80** (Austyn and Gordon, 1981). Dans un premier temps, les chercheurs ont rapporté que le F4/80 était spécifique des macrophages car il n'était pas exprimé par d'autres cellules d'origine hématopoïétique telles que les granulocytes ou les lymphocytes. De plus, il a été montré que le F4/80 n'est présent qu'à la surface des macrophages murins. Son utilité comme marqueur caractéristique des macrophages murins a été consolidée et démontrée dans plusieurs organes, tels que le rein, les organes lymphoïdes ou la moelle osseuse (Hume and Gordon, 1983; Hume *et al.*, 1983; Hume, Perry and Gordon, 1984). La présence exclusive du F4/80 sur les macrophages, a été réévaluée en 1991, par une équipe américaine qui a démontré que les polynucléaires éosinophiles possèdent également cet antigène à leur surface (McGarry and Stewart, 1991). Il a ensuite été prouvé que le F4/80 est constitutivement exprimé par la plupart des macrophages tissulaires murins, comme par la microglie dans le cerveau, ou les cellules de Kupffer (McKnight and Gordon, 1998).

Il a été suggéré que la structure de cette glycoprotéine et sa présence à la surface des cellules permet de médier l'inflammation. En effet, c'est par l'identification d'un domaine extracellulaire de type *epithelial growth factor* (EGF-*like*), ainsi qu'un motif à sept domaines transmembranaires (TM7), qu'est née cette supposition (Mcknight and Gordon, 1996). Le domaine EGF-*like* confère aux cellules un rôle dans l'adhérence cellulaire, les interactions récepteurs-ligands, l'organisation de la MEC ainsi que dans la différenciation cellulaire. La présence de TM7 quant à elle, permet la transduction de signaux d'un large panel de stimuli exogènes comme les hormones, les cytokines ou les neurotransmetteurs par exemple (dos Anjos Cassado, 2017). L'existence de ligands spécifiques pour de nombreux récepteurs EGF-*like*-TM7 suggère que le F4/80 possède une fonction similaire dans l'adhérence cellulaire, qui à son tour peut influencer la distribution, le

développement et le fonctionnement tissulaire *in vivo* (Hamann *et al.*, 1996; Stacey *et al.*, 2003; Gordon *et al.*, 2011).

Une unique fonction associée au F4/80 a clairement été identifiée en 1999 par des chercheurs allemands, qui ont pu démontrer que lorsque que celui-ci était bloqué par un anticorps monoclonal (mAb) spécifique, la sécrétion d'IFN-γ par les NK était diminuée (Warschkau and Kiderlen, 1999). *Ex vivo*, les macrophages de souris à déficit immunitaire combiné sévère (SCID) stimulés par *Listeria monocytogenes* inactivée secrètent du TNF et de l'IL-12. Ces cytokines pro-inflammatoires produites vont, à leur tour, activer les cellules NK qui vont libérer de l'IFN-γ. Il a été observé qu'en plus de la stimulation des cytokines, le contact cellule-cellule entre les macrophages et les NK fournissait un signal supplémentaire requis pour une réponse cellulaire NK optimale. Un rôle dans l'induction de tolérance a été montré impliquant le F4/80 dans la différenciation des lymphocytes T (LT) $CD8^+$ régulateurs (Lin *et al.*, 2005).

L'expression du F4/80 est aussi étroitement modulée selon l'état de différenciation ou d'activation des cellules. En effet, les monocytes sanguins sont connus pour exprimer moins de F4/80 que leurs descendants matures (Gordon *et al.*, 1992). Une plus faible expression est également observée sur les macrophages infectés par le bacille de Calmette-Guérin (BCG), ou ceux stimulés par de l'IFN-γ (Ezekowitz *et al.*, 1981; Ezekowitz and Gordon, 1982). Tandis que les niveaux d'expression de Mac-1 restent stables après infection au BCG. Ce phénomène s'accompagne d'une diminution de l'expression des récepteurs au mannose et des récepteurs Fc, ainsi que d'une augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), ce qui implique que ces variations sont directement liées à l'activation cellulaire (Ezekowitz *et al.*, 1981).

Globalement, l'expression du F4/80 varie en fonction de l'état général de la cellule : de son processus de développement, à son activation. La seule utilisation du CD11b ou du F4/80 pour désigner les macrophages tissulaires est insuffisante, car d'autres cellules myéloïdes sont maintenant connues pour les exprimer. Les macrophages ont une localisation tissulaire variée et possèdent nombre de marqueurs, qui, en fonction de l'état de différenciation ou de maturation de la cellule sont également plus ou moins exprimés. Ceux-ci sont abordés plus loin dans l'introduction.

2.3.4. Leurs fonctions : de l'homéostasie à l'homéostasie, en passant par l'inflammation

La distinction faite sur l'origine des macrophages s'avère être importante pour définir leurs fonctions. En effet, les macrophages résidents ont un rôle fondamental dans le développement, le maintien de l'homéostasie et la résolution de l'inflammation (Davies *et al.*, 2013; Patel, Ginhoux and Yona, 2021) (**Figure 5**).

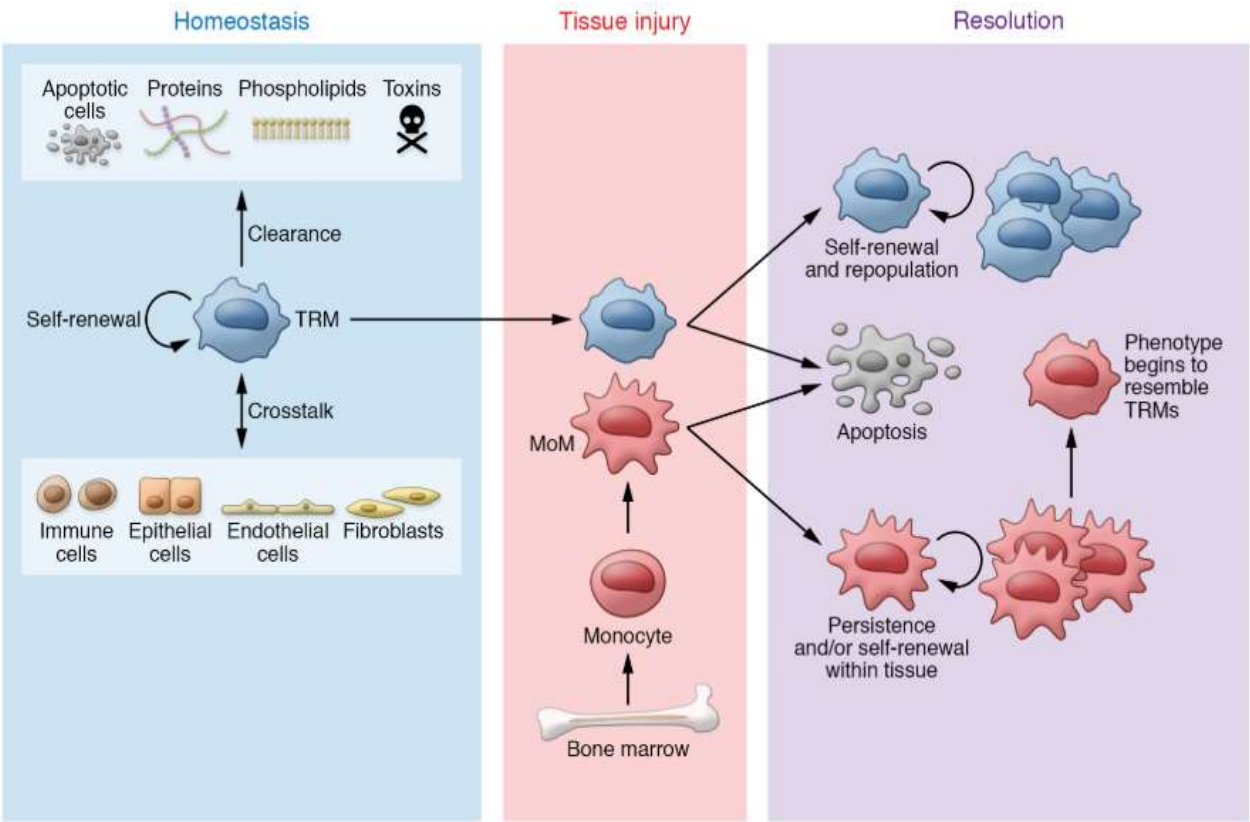


Figure 5 : Les macrophages résidents et les macrophages dérivés de monocytes jouent des rôles distincts dans les dommages tissulaires et la réparation des tissus.

Les macrophages résidents des tissus (TRM) proviennent du sac vitellin et du foie fœtal au cours du développement et persistent dans de nombreux tissus par auto-renouvellement. Au cours de l'homéostasie, les TRM éliminent, les cellules apoptotiques, des protéines et des agents pathogènes dans le microenvironnement local. De nombreux TRM sont capables de se maintenir par prolifération locale sans la contribution des macrophages dérivés de monocytes (MoM). Les TRM produisent une variété de facteurs qui stimulent l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires, des cellules épithéliales, des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules souches qui facilitent l'homéostasie tissulaire. En réponse à une lésion tissulaire, des monocytes dérivés de la moelle osseuse sont recrutés dans le tissu lésé, où ils se différencient en MoM. Au sein d'une lésion, les TRM et les MoM jouent des rôles distincts ; généralement, les MoM présentent une réponse inflammatoire plus importante. Au cours de la résolution de la lésion, les TRM meurent ou se multiplient par auto-renouvellement et repeuplent le tissu. Les MoM subissent une apoptose ou persistent, acquérant parfois la capacité d'auto-renouvellement. Au fil du temps, les phénotypes des TRM et des MoM deviennent de plus en plus similaires (Watanabe et al., 2019).

En condition d'homéostasie, les macrophages résidents éliminent les cellules apoptotiques, les protéines et les phospholipides et éliminent ou répondent aux toxines, particules et agents pathogènes dans leur microenvironnement local. Ils produisent également une variété de facteurs qui stimulent l'activation, la prolifération et la différenciation d'autres cellules immunitaires et des cellules épithéliales par exemple, favorisant cette homéostasie tissulaire. Certains macrophages dérivés de monocytes sont, eux, mobilisés uniquement en réponse à une lésion tissulaire ou à une infection. Ce sont ceux qui possèdent la réactivité la plus puissante à une inflammation, c'est pourquoi ils sont dits inflammatoires (Watanabe *et al.*, 2019) (**Figure 5**).

De façon intéressante, outre les fonctions des macrophages observées selon leur ontogénie, ceux-ci possèdent des propriétés fonctionnelles distinctes aussi selon leur localisation (Murray and Wynn, 2011). Une hétérogénéité de phénotypes et de fonctions est observable entre les macrophages d'un même tissu, comme c'est le cas pour les macrophages péritonéaux. Mais c'est également le cas entre les macrophages de tissus différents, comme entre les macrophages péritonéaux et les macrophages spléniques. Les macrophages péritonéaux expriment des niveaux hétérogènes de F4/80, en fonction de leur état de différenciation et d'activation (Taylor *et al.*, 2003). Ont été découverts deux sous-types de macrophages avec une expression différentielle de F4/80 dans le péritoine. Les macrophages péritonéaux F4/80^{high} et F4/80^{low} ont respectivement été définis comme *large peritoneal macrophages* (LPMs) et *small peritoneal macrophages* (SPMs), en association avec leur morphologie (Ghosn *et al.*, 2010; Cassado *et al.*, 2011). Cependant, environ 90 % des cellules F4/80^{+} du péritoine de différentes souches murines, telles que C57BL/6J ou Balb/c, ont montré une expression élevée de F4/80 (Ghosn *et al.*, 2010). Pour mieux discriminer ces populations, un autre marqueur a été utilisé et a permis de définir trois sous-populations distinctes, à savoir F4/80^{high} MHCII^{-}, F4/80^{low} MHCII^{high} et F4/80^{low} MHCII^{-}, qui correspondent respectivement aux LPMs, SPMs et granulocytes (Cassado *et al.*, 2011). *In vitro*, les LPMs adoptent généralement une morphologie de macrophage « classique », avec un cytoplasme abondant et des vacuoles proéminentes, tandis que les SPMs en culture présentent une morphologie polarisée avec des dendrites similaires à celles trouvées chez les DCs. Une analyse phénotypique a révélé que les SPMs affichent une expression accrue de MHCII et de L-sélectine. Inversement, les LPMs présentent des niveaux plus élevés de PRRs et de molécules co-stimulatrices. Ces deux sous-types de macrophages sont capables de phagocytose, même si les SPMs semblent être plus aptes à cette fonction *in vivo* (Ghosn *et al.*, 2010; Cassado *et al.*, 2011). Malgré ces différences, divers

stimuli, tels que le thioglycolate ou le LPS, induisent des changements similaires dans le péritoine, entraînant une disparition marquée des LPMs, une expansion des SPMs et une infiltration de monocytes (Ghosn *et al.*, 2010; Cassado *et al.*, 2011; Okabe and Medzhitov, 2014; Cassado, D'Império Lima and Bortoluci, 2015). Cet effet s'accompagne d'une augmentation de la production de NO et de cellules IL-12$^+$, principalement au sein de la population de SPMs (Cassado *et al.*, 2011). La disparition de la population de LPMs après stimulation a souvent été liée à la capacité d'adhérence tissulaire des macrophages, à la migration dans les ganglions lymphatiques drainants ou à la mort cellulaire (Okabe and Medzhitov, 2014). Au sein d'un même organe ou tissu, les macrophages possèdent diverses caractéristiques, appuyant la difficulté d'en analyser clairement les propriétés.

Les macrophages spléniques quant à eux, résident dans le plus gros organe lymphoïde secondaire (OLS) du corps. En effet, la rate assure le développement de réponses immunitaires contre les agents pathogènes présents dans la circulation sanguine. L'architecture splénique est divisée en trois parties : la pulpe rouge, la pulpe blanche et la zone marginale qui les sépare (Mebius and Kraal, 2005; Den Haan and Kraal, 2012; Lewis, Williams and Eisenbarth, 2019). Selon la localisation des macrophages dans ces zones, différentes fonctions associées dans le maintien de l'homéostasie et le développement de la réponse immunitaire ont été constatées. La plupart des macrophages spléniques agissent comme des sentinelles dans la détersion des agents pathogènes du sang périphérique et peuvent induire des réponses immunitaires pro- ou anti-inflammatoires en fonction des signaux environnants (Den Haan and Kraal, 2012; Borges Da Silva *et al.*, 2015; Kurotaki, Uede and Tamura, 2015). De la même façon que les macrophages péritonéaux, les macrophages spléniques constituent en réalité plusieurs populations cellulaires, possédant des caractéristiques un peu différentes. Si l'on étudie à l'échelle de l'organe, ou du tissu entier, il existe également des différences entre les macrophages péritonéaux et les macrophages spléniques. En effet, une étude faite à partir de macrophages murins F4/80$^+$ a démontré que premièrement, la morphologie des macrophages est différente. Les macrophages péritonéaux ont une taille significativement plus petite que les macrophages spléniques avant stimulation par du LPS. Cependant, cette différence n'est plus observée après stimulation des cellules (Liu *et al.*, 2006). Deuxièmement, en conditions normales les macrophages péritonéaux et spléniques expriment peu de MHCII, CD80, CD86 ou CD40. Cependant, même au repos et avec de bas niveaux d'expression de ces molécules, les macrophages spléniques expriment plus de

molécules MHCII, CD86 et CD40, ainsi que moins de CD80 que les macrophages péritonéaux. La différence d'expression de ces marqueurs cellulaires persiste dans des conditions où les macrophages sont stimulés par du LPS. De plus, les macrophages péritonéaux expriment des niveaux significativement plus élevés de TLR-2 et TLR-4 que les macrophages spléniques (Liu *et al.*, 2006) Les TLRs étant impliqués dans la reconnaissance de divers agents microbiens, ils sont capables d'induire des réponses distinctes. Enfin, un autre aspect a été étudié, celui de la production d'oxyde nitrique (NO). En effet, le NO est l'un des médiateurs importants pour la fonction microbicide des macrophages (Ammon *et al.*, 2000). Sans stimulation par le LPS, les macrophages spléniques et péritonéaux produisent spontanément des niveaux détectables de NO. Cependant, les macrophages spléniques sécrètent des niveaux de NO significativement plus élevés que les macrophages péritonéaux. Après stimulation au LPS, les deux types de macrophages tissulaires produisent une grande quantité de NO, mais les macrophages spléniques en produisent nettement plus. Les différentes réponses, y compris le phénotype cellulaire et la production de NO par les deux types de macrophages tissulaires, après stimulation au LPS, suggèrent que ces cellules pourraient être des sous-populations fonctionnellement distinctes. Par ailleurs, les macrophages péritonéaux présentent des niveaux plus élevés de TLR-2 et TLR-4, suggérant qu'ils pourraient avoir une plus grande capacité de reconnaissance et de phagocytose des agents pathogènes ou d'autres stimuli étrangers, qui sont reconnus par certains TLRs. Aussi, il a été rapporté que les macrophages spléniques produisent plus d'IL-1 et d'IL-12, moins d'IL-6 et de prostaglandines, ainsi que des niveaux similaires de TNF que les macrophages péritonéaux ou les macrophages d'autres tissus, tels que le foie et les poumons (Wu *et al.*, 1993; Ogle *et al.*, 1994). Au vu de leurs propriétés, il est alors étonnant de constater que les macrophages spléniques expriment des niveaux plus faibles de TLR-4 que les macrophages péritonéaux. En résumé, l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages pourrait être liée à une grande diversité de facteurs, notamment différentes cellules précurseurs, différents stades de différenciation, différents microenvironnements ou même différents facteurs de stimulation. La complexité de ces données soutient la difficulté qu'est d'étudier ce type cellulaire à travers divers organes et même au sein d'un unique organe, compte tenu des phénotypes et fonctions variés dont les macrophages disposent.

2.3.4.1. Une nomenclature érigée sur la base de leurs fonctions

L'observation qu'il existe des populations de macrophages aux fonctions différentes, a donné lieu à une classification décrivant deux sous-types de macrophages intervenant dans les processus inflammatoires. C'est en 2000 qu'une équipe américaine a proposé cette nomenclature basée sur la propension des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDMs) d'une souche murine à être différemment activés, *in vitro* par le LPS. L'étude a été menée chez les C57BL/6J et les Balb/c. Le LPS étant utilisé *in vitro* en expérimentation, afin de modéliser au mieux l'induction d'une inflammation aiguë, les auteurs s'attendaient à obtenir des résultats homogènes quelle que soit la souche de souris. Mais il s'avère que ce n'était pas le cas. En effet, la souche de souris C57BL/6J exprimait de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), permettant aux cellules de produire du NO. Comparativement, les souris Balb/c n'en exprimaient pas après stimulation par le LPS, mais surtout, exprimaient de l'arginase-1 (Arg-1) qui permet la production d'ornithine à la place de la production de NO (Mills *et al.*, 2000).

Ces différents types de macrophages ont alors été nommés M1 et M2, en référence à la terminologie employée pour discriminer les lymphocytes T *helpers* 1 (Th1) et Th2 qui prévalent dans les souches de souris (Mosmann *et al.*, 1986). Ainsi, les M1 sont les macrophages qui produisent du NO, inhibant la réplication cellulaire et intervenant dans la formation de ROS, tandis que les M2 favorisent le métabolisme de l'arginine en ornithine *via* l'expression d'Arg-1 et inhibent la production de NO (Nathan and Hibbs, 1991). Ainsi, les macrophages M1 et M2 peuvent influencer les réactions immunitaires de manière opposée.

2.3.4.2. Les macrophages M1 dans l'initiation de l'inflammation

Les macrophages constituent un des types cellulaires rapidement recrutés en phase aiguë de l'inflammation. C'est-à-dire aussitôt qu'un pathogène infectieux ou qu'un dommage interne (*via* les PAMPs et/ou les DAMPs) est détecté, ou lorsque des cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF sont secrétées. En réponse à ces stimuli, les macrophages produisent et secrètent de hauts niveaux de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23 et de bas niveaux d'IL-10, reflétant leur fonction M1 pro-inflammatoire (Oishi and Manabe, 2018).

Les macrophages M1 participent à l'élimination des agents pathogènes *via* l'activation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) du système oxydatif et la génération subséquente de ROS. Par conséquent, les M1 ont une activité antimicrobienne puissante et

participent aux dommages tissulaires induits par les ROS. Aussi, ils altèrent la régénération des tissus et la cicatrisation des plaies (Mantovani *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014; Shapouri - Moghaddam *et al.*, 2018). Tant que l'infection sera présente, l'inflammation persistera et davantage de cellules immunitaires continueront d'être recrutées ; le tout dans le but d'éliminer l'infection et de restaurer un équilibre homéostatique.

Au cours du processus de cicatrisation, les macrophages M1 présents peuvent être influencés par l'environnement inflammatoire en constante évolution et orienter leur polarisation en macrophages M2 (Martinez and Gordon, 2014; Wynn and Vannella, 2016).

2.3.4.3. Les macrophages M2 dans la résolution de l'inflammation

Les cytokines, telles que l'IL-4 et l'IL-13, présentes dans cet environnement inflammatoire induisent le phénotype M2 qui possède des fonctions anti-inflammatoires (Chawla, Nguyen and Goh, 2011; Shapouri - Moghaddam *et al.*, 2018). D'autres cytokines telles que l'IL-10 et l'IL-21 peuvent régir la polarisation M2, tout comme l'IL-33 qui amplifie la polarisation M2 induite par l'IL-13. Sur le plan fonctionnel, ces macrophages ont une puissante capacité de phagocytose, ils éliminent les débris et cellules apoptotiques, et participent majoritairement aux dernières étapes de l'inflammation, à savoir, la régénération tissulaire et la cicatrisation, *via* notamment, une faible production d'IL-12 et une production élevée d'IL-10 et de *transforming growth factor* β (TGF-β). (Chawla, Nguyen and Goh, 2011; Krzyszczyk *et al.*, 2018; Shapouri - Moghaddam *et al.*, 2018). Les processus de guérison après une lésion tissulaire, comme c'est le cas dans les plaies cutanées, peuvent être distingués par : la régénération et la réparation/cicatrisation. La régénération fait référence à la prolifération de cellules et de tissus pour remplacer les structures endommagées et perdues. Lors d'une régénération complète, un tissu endommagé est complètement reconstitué. Par contre, la réparation tissulaire peut restaurer une partie de la structure d'origine, mais la reconstitution demeure incomplète et peut provoquer une perturbation structurelle. Les contributions relatives de la régénération et de la cicatrisation varient en fonction de la capacité de régénération du tissu et de l'étendue et de la nature de la lésion (Wynn and Vannella, 2016). L'ensemble de ces deux procédés constitue la résolution de l'inflammation. Les macrophages M2 y sont impliqués, d'une part, en activant des progéniteurs multipotents, en évacuant les débris cellulaires, mais aussi en organisant une partie du remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) après des dommages ou lésions, pour enfin, favoriser l'angiogenèse. Lorsque le processus inflammatoire se déroule correctement, c'est-à-dire, lorsque les cellules recrutées au site de

dommages, induisent une régénération saine et une bonne cicatrisation, des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et le TGF-β, sont synthétisées afin de contrôler cette inflammation (Germolec *et al.*, 2018; Kourtzelis, Hajishengallis and Chavakis, 2020; Raziyeva *et al.*, 2021) (Figure 6).

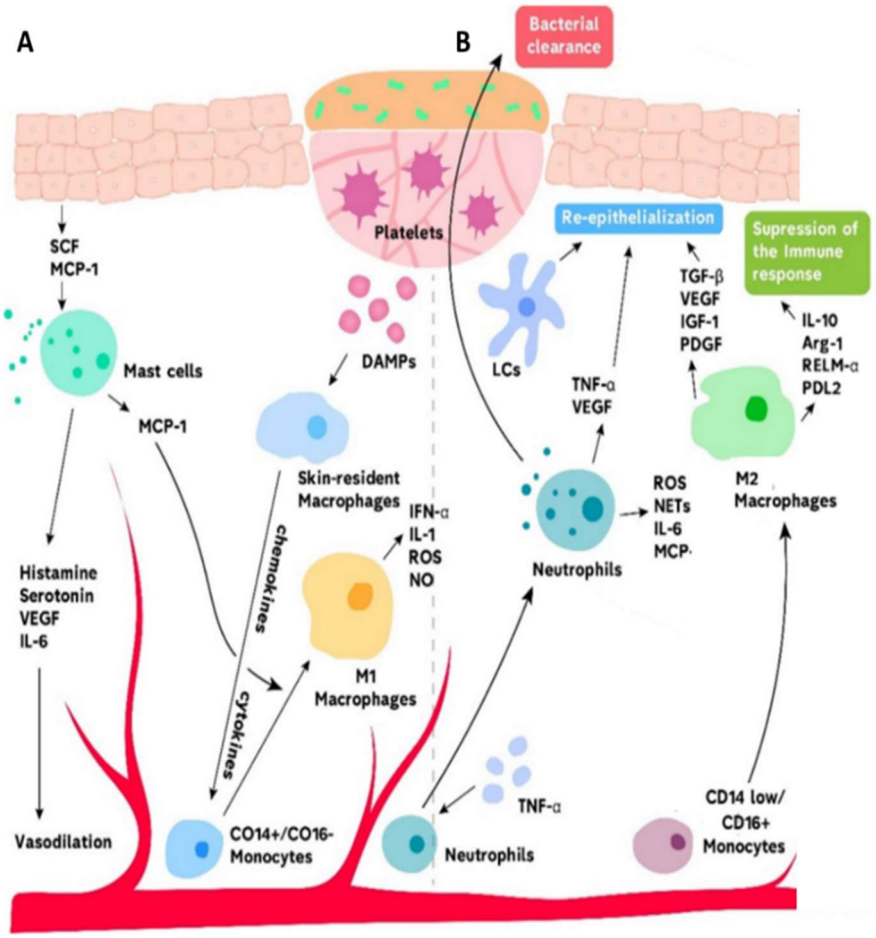


Figure 6 : L'implication du système immunitaire dans l'inflammation aiguë : de l'initiation à la résolution.
A) Exemple d'inflammation cutanée où les macrophages résidant dans la peau sont les premières cellules immunitaires à réagir aux lésions. Lorsqu'ils sont activés par des DAMPs, ils libèrent des cytokines et des chimiokines pour recruter des neutrophiles et des monocytes au site d'infection. Les monocytes se différencient alors en macrophages M1 pro-inflammatoires. Les mastocytes présents facilitent aussi cette différenciation de monocytes en sécrétant la protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1), ils sécrètent également des médiateurs favorisant la vasodilatation et le recrutement de cellules immunitaires. Les macrophages M1 activés libèrent des ROS et d'autres médiateurs qui favorisent la détersion bactérienne. B) Les cellules de Langerhans (LCs) favorisent la réparation des tissus, bien que le mécanisme précis ne soit pas clair. Les macrophages M2 anti-inflammatoires ou pro-résolution contribuent à la réparation des tissus et à l'inhibition de l'inflammation, ainsi qu'à la réépithélialisation des tissus. (figure adaptée à partir de Raziyeva et al., 2021).

L'importance des macrophages dans la cicatrisation des tissus est soulignée dans une étude réalisée chez la souris, où ceux-ci ont été déplétés (Lucas *et al.*, 2010). En effet, l'absence de macrophages durant l'inflammation a permis de mettre en évidence que ces cellules participent

à la bonne revascularisation du tissu endommagé, en l'occurrence la peau, mais également qu'ils participent à sa réépithélialisation et à la minimisation de la formation de cicatrices. De plus, lorsque les macrophages ont été déplétés en phase de reconstruction du tissu, et non pas en phase d'initiation de l'inflammation, des hémorragies ainsi qu'un échec de cicatrisation de la plaie ont été remarqués. Ces modèles de déplétion prouvent que les macrophages sont importants dans la résolution de l'inflammation de par leur soutien trophique et de communication avec les autres cellules (Lucas *et al.*, 2010).

À noter, les macrophages résidents sont parfois appelés «M2-*like*» car ils possèdent des propriétés similaires aux macrophages M2 (Davies *et al.*, 2013). Aussi, il a été démontré que ces macrophages résidents étaient capables d'auto-renouvellement en réponse au M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), dans les tissus inflammés (Davies *et al.*, 2011, 2013). Il est également possible qu'un repeuplement se fasse *via* la différenciation de monocytes en macrophages, ou bien par une combinaison de ces deux procédés (Yona *et al.*, 2013; Bonnardel *et al.*, 2019).

En somme, sans inflammation les infections ne seraient pas contrôlées, les plaies cicatriseraient peu et mal ; et sans les cellules immunitaires, dont les M1 et les M2, ces processus inflammatoires ne pourraient correctement se dérouler. Il est donc nécessaire, qu'une inflammation s'instaure avec la présence de tous ses acteurs, afin de restaurer un tissu sain.

Cependant, il peut arriver que les cellules de défense innée ne parviennent pas à stopper correctement l'inflammation en phase aiguë. Cela peut être le cas lorsqu'un déséquilibre se crée entre le recrutement, la division, la migration et l'apoptose des cellules immunitaires. Si la cause de l'inflammation persiste, une mauvaise réparation tissulaire, ainsi qu'une accumulation de cellules peut se créer au site de lésion. Une « cicatrisation excessive » est observée, sans résolution de l'inflammation, pouvant mener à son aggravation : l'inflammation chronique (Kumar *et al.*, 2010) (**Figure 7**). Dans cette situation, la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires augmente, comme par exemple le TNF ou l'IL-1, ce qui prolonge la durée de vie des macrophages M1 et autres cellules immunitaires (**Figure 8**). L'infection ou le dommage progresse, le déséquilibre tissulaire et cellulaire se creuse et dans le cas d'une lésion cutanée, la réépithélialisation est défectueuse. L'inflammation chronique est entretenue et constitue une alternative délétère à la résolution de l'inflammation (Oishi and Manabe, 2018).

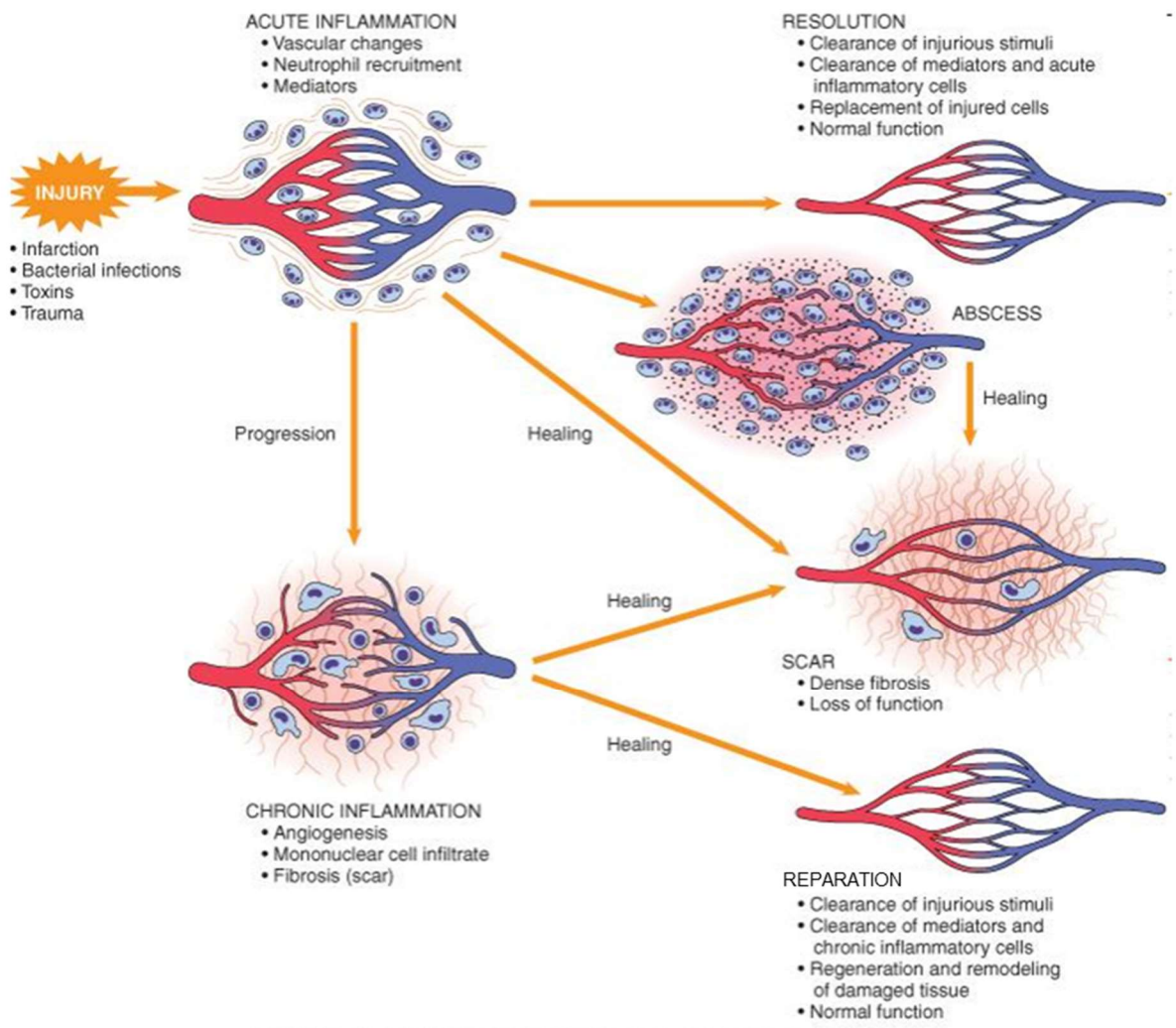


Figure 7 : Processus tissulaires de cicatrisation dans l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique.
L'inflammation aiguë est la réponse initiale aux stimuli nocifs. Au niveau des tissus elle se traduit par des modifications de l'environnement vasculaire et un recrutement de médiateurs cellulaires de l'inflammation. Lorsque la cause de l'inflammation aiguë est contenue, la résolution de l'inflammation débute. La détersion de l'organe ou du tissu concerné se met en place et celui-ci retrouve ses fonctions normales. Cependant, si le pathogène persiste, les tissus peuvent réagir de diverses manières. Si la vascularisation locale au site de lésion est endommagée et que les médiateurs cellulaires de l'inflammation prolifèrent, un abcès peut se former. Un abcès est une accumulation de phagocytes en état de mort, accompagné d'agents bactériens, entretenant le processus infectieux. Celui-ci est associé à une inefficacité de la résolution de l'inflammation et ne cicatrise pas tant qu'il n'est pas collecté. Une fois vidé, la peau et l'environnement cellulaire finira par former un environnement dense en fibrose (ou nommé « cicatrisation excessive ») et sera accompagné d'une perte de fonction plus ou moins importante de l'organe ou du tissu. Cette cicatrisation dense en fibrose peut néanmoins survenir sans passer par la formation d'un abcès purulent. Enfin, si aucun de ces cas de figure ne se présente et que l'inflammation aiguë progresse, l'inflammation chronique s'installe. L'inflammation chronique est un état pathologique caractérisé par une inflammation active, concomitante à la destruction des tissus et des tentatives de réparation de ceux-ci. Elle est associée à l'angiogenèse des petits vaisseaux, l'infiltration continue de cellules du MPS, ainsi qu'à une cicatrisation fibrotique. L'inflammation chronique débouche, dans la plupart des cas, sur une cicatrisation dense en fibrose, mais elle peut aussi aboutir, dans le meilleur des cas, à une réparation tissulaire accompagnée d'un rétablissement des fonctions de l'organe ou du tissu lésé (Kumar et al., 2010).

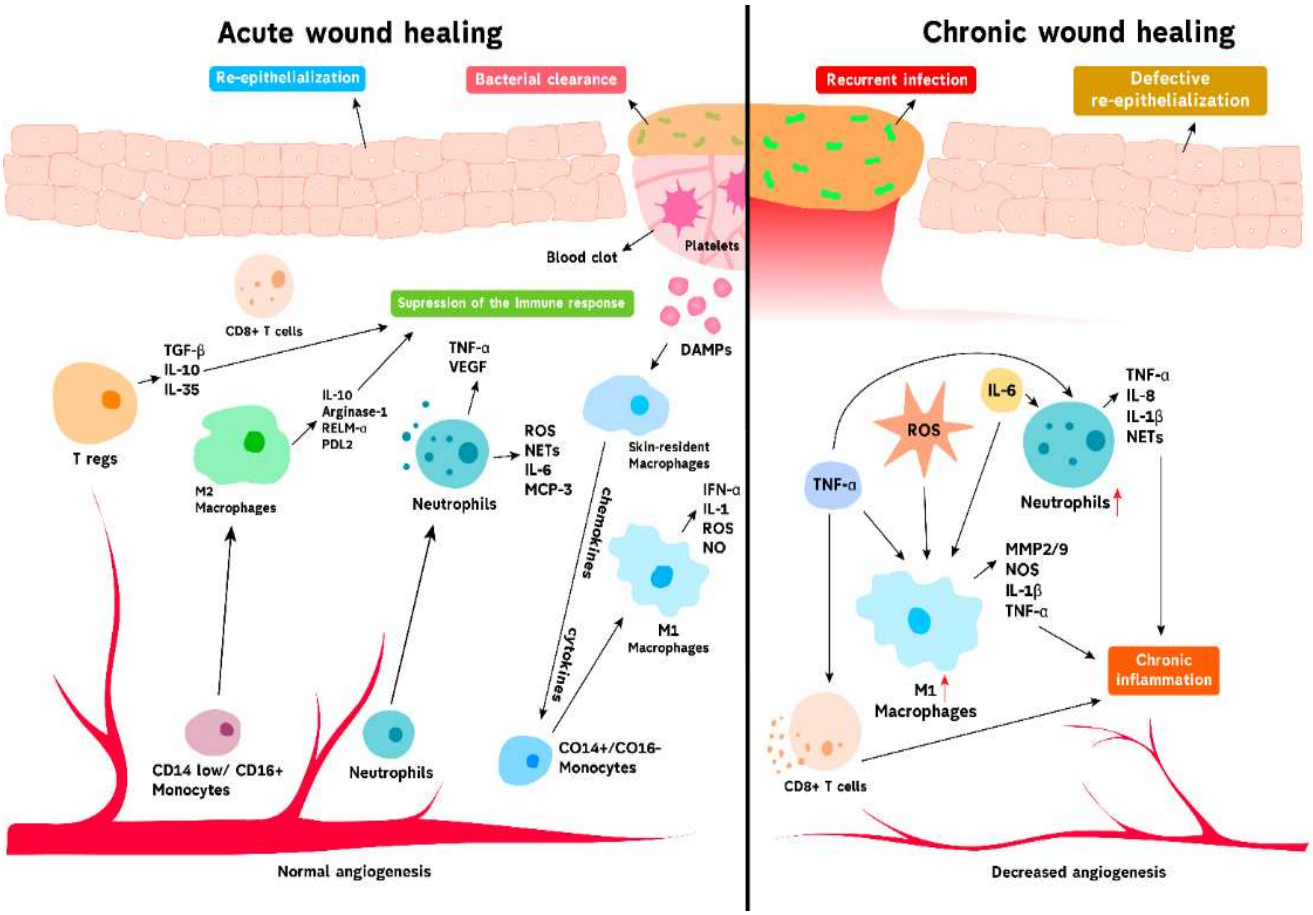


Figure 8 : Processus cellulaires de cicatrisation cutanée. De l'inflammation aiguë à l'inflammation chronique. Lors du processus de cicatrisation dans l'inflammation aiguë, (figure de gauche), après lésion du derme par exemple, les macrophages résidents de la peau sont activés par des DAMPs et libèrent des cytokines et chimiokines afin de recruter des neutrophiles et des monocytes au site de lésion. Les monocytes se différencient alors en macrophages M1 pro-inflammatoires. Les macrophages M2 contribuent, quant à eux, à la réparation des tissus et à l'inhibition de l'inflammation. Lors du processus de cicatrisation dans l'inflammation chronique (figure de droite), l'angiogenèse diminue, le processus de réépithélialisation est altéré et une surabondance de ROS est retrouvée au niveau de la lésion. La présence prolongée de neutrophiles et de macrophages M1 participe au statut hautement inflammatoire du tissu. Cela est renforcé par l'activité des mastocytes et des lymphocytes. L'inflammation est entretenue ainsi qu'une fibrose tissulaire et une mauvaise vascularisation (graphical abstract issu de Raziyeva et al., 2021 sur https://www.mdpi.com/2218-273X/11/5/700).

Ainsi, la résolution de l'inflammation consiste en un phénomène de régénération complet, tandis que la mise en place d'une inflammation chronique indique une persistance de la cause de l'inflammation, associée à un échec de résolution de l'inflammation. L'exposition prolongée du système immunitaire inné mène bien souvent à de l'inflammation chronique qui peut être à l'origine de pathologies diverses (Raziyeva *et al.*, 2021).

Au cours de la cicatrisation, les monocytes recrutés sont influencés par l'environnement de la plaie en constante évolution, ce qui pourrait affecter leur polarisation M1 en macrophages M2 (Martinez and Gordon, 2014). Plusieurs études ont confirmé l'hypothèse selon laquelle ce sont les mêmes macrophages qui régulent les fonctions inflammatoires aiguës et les fonctions de régénération tissulaire ultérieures (Wynn and Vannella, 2016). Ces observations montrent que l'environnement tissulaire local ou certaines fonctions des macrophages peuvent induire leur changement phénotypique et fonctionnel dans la cicatrisation des plaies (Das *et al.*, 2015). Une régulation de la polarisation M1/M2 est donc importante pour achever correctement le processus inflammatoire.

2.3.4.4. Des macrophages M1 aux macrophages M2, un *continuum*

Un passage rapide et important d'un phénotype M1 pro-inflammatoire à un phénotype M2 anti-inflammatoire aboutit à une « cicatrisation excessive ». Les M2 synthétisent naturellement des protéines de la MEC ainsi que du TGF-β et des métalloprotéinases matricielles-10 (MMP-10) contribuant à la bonne cicatrisation des lésions (Feng *et al.*, 2019). Néanmoins, si le changement de phénotype est trop brusque, les M2 vont produire ces molécules en abondance. Cela aura un retentissement tel, qu'en phase de résolution de l'inflammation, la fibrose de la lésion cicatricielle va se densifier, voire même s'hypertrophier, ne permettant pas une restauration du tissu normal (DiPietro, Wilgus and Koh, 2021) (**Figure 7**).

Cependant, la dichotomie M1/M2 n'est pas suffisante pour décrire les multiples fonctions et phénotypes des macrophages *in vivo*, surtout au sein de processus dynamiques (Stables *et al.*, 2011; Witherel *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021). En effet, les cellules du MPS sont exposées à une multitude de signaux *in vivo*, souvent opposés, ainsi qu'à une temporalité d'activation différente. Les macrophages sont des cellules plastiques, capables de changer de phénotype afin de s'adapter au mieux à leur environnement. La polarisation de la fonction des macrophages M1 et M2 doit être considérée comme un évènement conceptuel simplifié et utile sur le plan opérationnel décrivant un *continuum* d'états fonctionnels divers (Chambers *et al.*, 2021) (**Figure 9**). En 2004, une équipe de chercheurs italiens a proposé de scinder le phénotype M2 en phénotypes M2a, M2b et M2c, basés sur les molécules activant chacun de ces phénotypes, ainsi que sur leurs profils d'expressions géniques (Mantovani *et al.*, 2004). Par la suite, le phénotype M2d a été ajouté à cette nomenclature (Duluc *et al.*, 2007) (**Figure 9**).

. Plus tard, les différentes fonctions de ces macrophages qui répondent à des stimulations différents, ont été ajoutées à leurs phénotypes complexes (Martinez and Gordon, 2014; Krzyszczyk *et al.*, 2018).

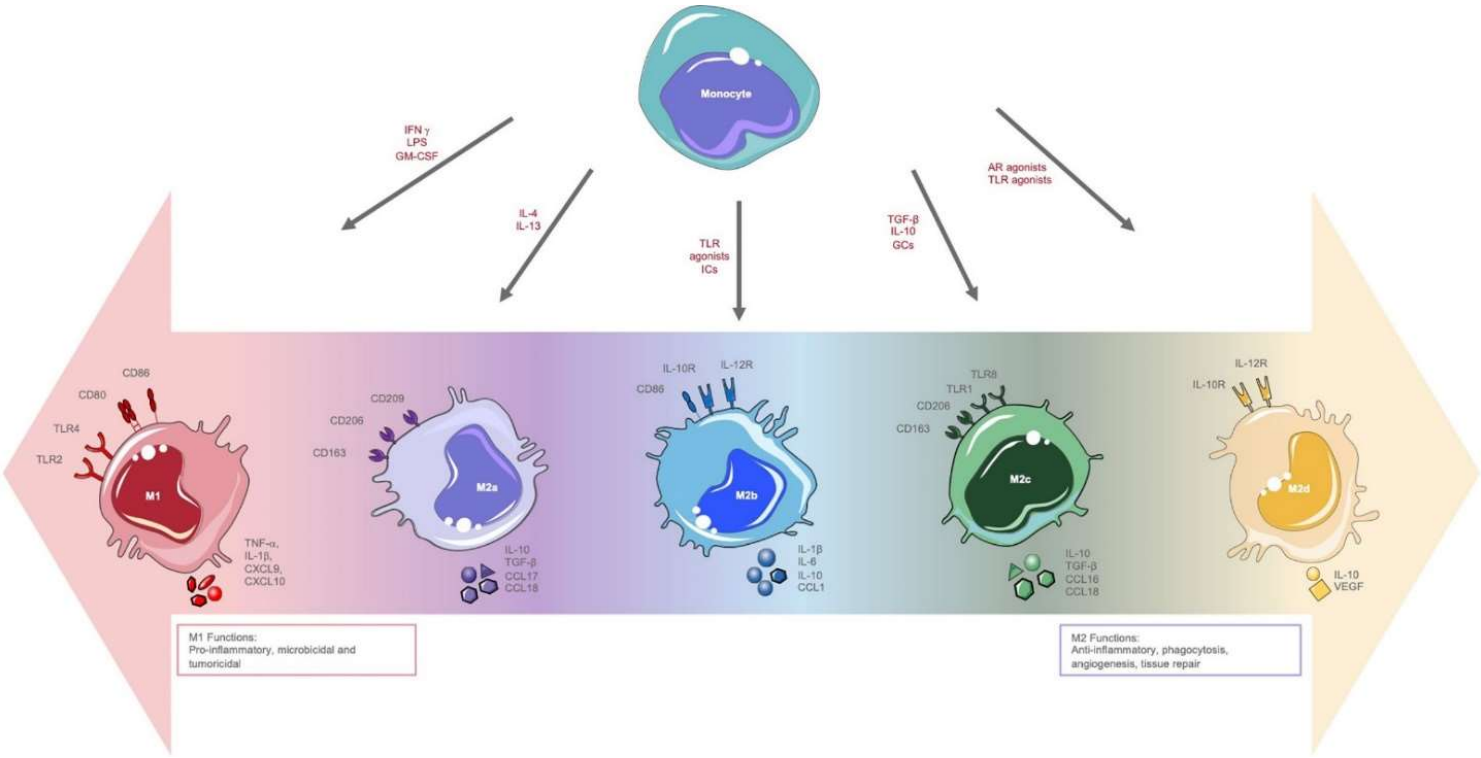


Figure 9 : Le phénomène de polarisation des macrophages.
Vue d'ensemble du spectre de polarisation des macrophages mettant en avant les stimuli, l'expression des marqueurs de surface, la sécrétion de cytokines, de chimiokines et les fonctions des macrophages polarisés M1 et M2. AR: adenosine receptor ; CCL: chemokine (CC motif) ligand ; CXCL: chemokine (CXC) ligand ; GC: glucocorticoids ; IC: immune complexes ; VEGF, vascular endothelial growth factor (Chambers et al., 2021).

En 2014, l'équipe de Mantovani a proposé des efforts de standardisation de leur nomenclature pour tenter de réunir les caractéristiques des M1 et des quatre sous-types de M2 *in vitro*. L'objectif étant de la consolider et la normaliser (Murray *et al.*, 2014). Car en effet, les principaux freins à l'utilisation de cette terminologie dans les études menées *in vivo* sont :

- Qu'elle ignore le contexte et la source des stimuli,
- Ces stimuli ne sont pas exclusivement adressés soit aux M1, soit aux M2,
- Qu'elle ignore la multiplicité des signaux dans l'environnement *in vivo*. Enfin,
- Qu'au sein d'une population de macrophages, ceux-ci peuvent ne pas être activés de façon uniforme, ni proliférer avec des phénotypes et fonctions strictement identiques (Martinez and Gordon, 2014).

Les cellules, comme les macrophages ou les DCs, possèdent des phénotypes et des fonctions assez versatiles et sont adaptables aux conditions de stimulation. Pour autant, la dichotomie M1/M2 a aidé et aide aujourd'hui encore la communauté scientifique à y voir plus clair au sein de réactions classées pro- ou anti-inflammatoires *in vitro*. Par exemple, les M1 et M2 expriment des récepteurs de chimiokines distincts. L'expression différentielle des composants du système de chimiokines par les macrophages polarisés oriente ces cellules dans des voies de résistance ou de promotion de pathogènes microbiens, de tumeurs, mais encore dans des voies d'immunorégulation, de réparation et de remodelage tissulaire (Mantovani *et al.*, 2004). Par exemple, l'activation par le LPS associé à l'IFN-**γ,** de monocytes ou de macrophages entraîne la production de chimiokines pro-inflammatoires dépendantes de NF-κB, telles que les chimiokines CXCL 9 et CXCL10, ainsi que la chimiokine CCL5 (Mantovani *et al.*, 2004). Tandis que les signaux influençant un phénotype M2 inhibent généralement l'expression des chimiokines associées aux M1 ; l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la production de CXCL9, CXCL10 ou CCL5 (Mantovani *et al.*, 2002). Les effets inhibiteurs de l'IL-10 sur les macrophages activés reposent en partie sur l'inhibition de NF-κB (Li and Verma, 2002).

Afin de différencier les M1 des M2, des marqueurs de surface, des profils transcriptomiques, ainsi que des cytokines secrétées en réponse aux divers stimuli environnementaux ont été mis en évidence. Bien que ceux-ci ne reflètent pas parfaitement un environnement *in vivo*, ils sont expérimentalement très utiles.

2.3.5. Le phénotype M1 : pro-inflammatoire

Des molécules portées à la membrane des macrophages pro-inflammatoires témoignent de leurs fonctions. Par exemple, la présence de molécules du MHC à la surface cellulaire traduit la fonction de présentation d'antigènes, dont sont dotés les macrophages. De plus, ceux-ci expriment les molécules CD80 et CD86, ce qui suggère qu'ils sont impliqués dans la co-stimulation des lymphocytes. L'expression du MHC et des CD80, CD86 par les macrophages, leur permet d'être des cellules présentatrices d'antigènes (APCs) efficaces.

En 1980, Jean Dausset, George Snell et Baruj Benaceraff, ont reçu le prix Nobel de médecine/physiologie pour leurs découvertes concernant des structures génétiquement déterminées, à la surface de cellules, qui régulent les réactions immunologiques ; en l'occurrence, le MHC. Ce complexe est appelé antigène leucocytaire humain (HLA) chez l'Homme, ou H2 chez

la souris. Il existe deux familles de MHC impliquées dans la présentation d'antigènes : le MHCI et le MHCII. Les antigènes extracellulaires sont pris en charge par les APCs, telles que les macrophages, qui les phagocytent, les internalisent, les digèrent et les chargent à leur surface *via* les **MHCII**. Les antigènes peuvent alors être reconnus par les lymphocytes T $CD4^+$. Ce processus fait partie de la voie endosomale des APCs. Tandis que les antigènes intracellulaires, tels que les parasites, les virus ou antigènes tumoraux, peuvent être présentés par les cellules nucléées infectées après protéolyse cytoplasmique. Les peptides issus de cette dégradation sont ensuite chargés sur les MHCI dans le réticulum endoplasmique, pour être transportés et adressées à la membrane cellulaire (Kobayashi and van den Elsen, 2012) (**Figure 10**). Une autre situation peut cependant se présenter : il s'agit de la *cross*-présentation. Ce terme désigne la capacité de certaines APCs à lier, dégrader et présenter des antigènes extracellulaires *via* des molécules du MHC de classe I aux cellules T $CD8^+$. Ce phénomène de *cross*-présentation décrit la stimulation des lymphocytes cytotoxiques naïfs par ce processus nécessaire à l'induction d'une réponse immunitaire contre les virus qui n'infectent pas les APCs (Heath and Carbone, 2001; Bevan, 2006).

À la surface des macrophages, le niveau d'expression des molécules de classe II, révèle leur état de maturation et d'activation (Shapouri - Moghaddam *et al.*, 2018). En effet, le MHCII est une molécule phare, intervenant dans les processus de coopération entre le système immunitaire inné et adaptatif (Jain and Pasare, 2017). Lorsque celle-ci est fortement exprimée, cela traduit l'activation du système immunitaire et suggère alors que les cellules qui la portent se trouvent plutôt dans des conditions pro-inflammatoires. En effet, l'expression du MHCII par les macrophages est notamment induite par la présence d'IFN-γ (Xaus *et al.*, 2000; Buxadé *et al.*, 2018). Cependant, il est important d'insister sur la capacité de ces cellules à exprimer des niveaux faibles ou modérés de MHCII, afin d'assurer une tolérance immunitaire, tout en leur permettant, simultanément, de mener une surveillance locale, tant que les conditions homéostatiques prévalent. Lorsqu'une inflammation s'instaure, l'expression de MHCII est régulée à la hausse, à mesure qu'ils acquièrent un profil M1 pro-inflammatoire (Buxadé *et al.*, 2018; Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

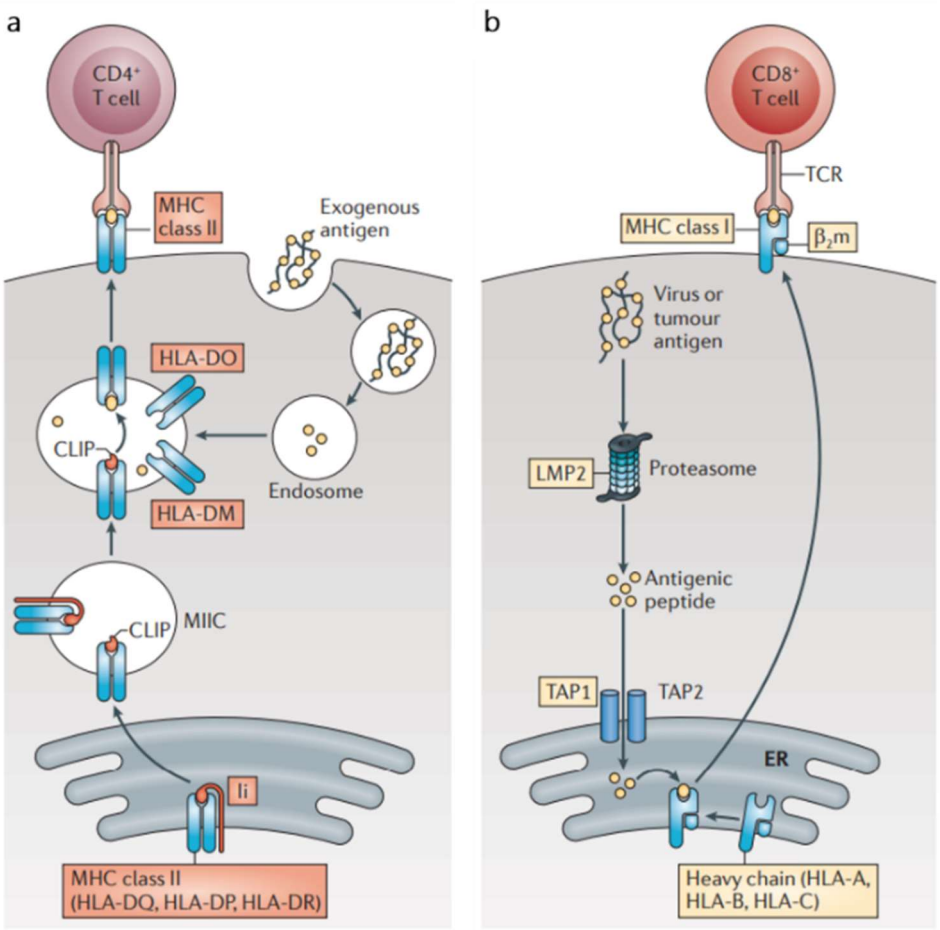


Figure 10 : Voies classiques de présentation des antigènes par les MHCII et MHCI.
a) Les antigènes extracellulaires sont digérés en peptides par des enzymes endolysosomales. Ces peptides se lient du complexe MHCII en déplaçant le peptide de la chaîne invariante associé à la classe II (CLIP), lui-même dérivé de la chaîne invariable associée au MHCII (Ii). HLA-DO et HLA-DM régulent le processus de charge antigénique à disposer au sein du sillon du MHCII. b) Les antigènes intracellulaires sont, quant à eux, transformés en peptides après adressage au protéasome. Les peptides générés sont transportés jusqu'au réticulum endoplasmique (ER), où ils sont chargés dans le sillon du MHCI. MIIC: MHCII compartiment ; TAP: transporter associated with antigen processing ; TCR: T-cell receptor (Kobayashi et al., 2012).

Le MHCII n'est pas la seule molécule dont l'expression augmente en condition inflammatoire. Deux autres marqueurs sont utiles pour discriminer l'état fonctionnel des macrophages, il s'agit du **CD80** et du **CD86** (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

En 1982, les équipes de Takashi Yokoshi et Arnold S. Freedman ont détecté, *via* l'utilisation d'un mAb, un antigène d'expression sélective à la surface de lymphocytes B (LB), le CD80 (Yokochi, Holly and Clark, 1982; Freedman *et al.*, 1987). Gordon J. Freeman et Peter S. Linsley ont ensuite suggéré que le CD80 avait un rôle dans l'activation et la prolifération des LB *via* sa liaison au CD28 présent à la surface des lymphocytes T (LT) (Freeman *et al.*, 1989; Linsley, Clark and Ledbetter, 1990). L'interaction des cellules B et T a ainsi été mise en évidence *via* CD80. Consécutivement à

ces découvertes, Claude D. Gimmi a établi la présence de CD80 sur toutes les APCs, pouvant faire office de molécule de co-stimulation à l'activation de LT (Gimmi *et al.*, 1991). Frances Galvin l'a ensuite mis en évidence et Ziba Razi-Wolf a souligné l'expression modulée de cette molécule à la surface de macrophages stimulés par la Concanavalin A (Galvin *et al.*, 1992; Razi-Wolf *et al.*, 1992).

Le CD86, quant à lui, a été décrit pour la première fois en 1993, comme étant le second ligand du CD28, présent à la surface d'APCs (Azuma *et al.*, 1993; G. Freeman *et al.*, 1993; G. J. Freeman *et al.*, 1993). En même temps, les chercheurs ont identifié la liaison de CD80 et CD86 à un compétiteur de la co-stimulation de CD28 : la *cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4), découverte quelques années auparavant (Brunet *et al.*, 1987). C'est ainsi grâce aux interactions CD80-CD28 ou CD80-CTLA-4 que Miyuki Azuma et Gordon J. Freeman ont identifié le CD86. En effet, grâce à l'utilisation d'anticorps anti-CD28 et anti-CD80, il se sont aperçus d'une discordance dans les résultats attendus : l'inhibition de l'interaction CD80-CD28 n'était pas effective. Ils ont alors trouvé la présence d'une glycoprotéine dont les propriétés étaient inconnues ; l'ont cloné et ont découvert qu'elle était un ligand de CD28 et CTLA-4, comme l'est le CD80 ; ils venaient d'identifier le CD86.

C'est dans les années 1990 que l'importance de cette voie d'activation/inhibition (CD28/CTLA-4) de l'immunité adaptative, médiée par les cellules de l'immunité innée, a été mise en lumière. En effet, le blocage de CD28 par un mAb ; ainsi que la liaison des molécules B7 à une protéine de fusion CTLA-4-Ig, ont permis de constater une hyporéactivité des lymphocytes T à une stimulation secondaire *in vitro*, mettant en avant une altération de la réponse immunitaire (Tan *et al.*, 1993). Après avoir été démontré compétiteur, CTLA-4 a été démontré inhibiteur de la réponse immunitaire (Lenschow *et al.*, 1992, 1993; Walunas *et al.*, 1994). Ces propos servent ainsi la pertinence d'étude et de considération des molécules CD80 et CD86, au vu de leur implication dans la régulation de la réponse immunitaire.

Une variété de stimuli a été étudiée dans le contrôle de l'expression des molécules CD80 et CD86. Ceux qui semblent entraîner une variation de leur expression sur les macrophages sont l'IFN-γ, l'IFN-α, le GM-CSF et le LPS (Sansom, 2000). Comme démontré précédemment, l'environnement cellulaire et tissulaire local influence la polarisation des macrophages. La présence de ces stimulants va majoritairement les orienter vers un phénotype pro-inflammatoire. Il se peut pour autant, que des macrophages ne promeuvent pas l'inflammation, bien qu'ils soient placés en

condition favorable pour. Étudier le vivant démontre bien qu'il n'existe pas de condition où la théorie explique tout. L'activation et la polarisation des macrophages est un axe de recherche complexe car il n'existe pas de moyen simple pour définir avec précision comment les macrophages ont été stimulés dans des microenvironnements immunitaires complexes. Le concept existant de *continuum* entre M1 et M2 est davantage supporté par le fait que la polarisation entre ces deux phénotypes se fait au sein des mêmes populations cellulaires, dans un microenvironnement changeant. C'est pourquoi les niveaux d'expression des molécules de surface varient selon l'état de la cellule. Si un macrophage tissulaire se trouve proche d'une agression, il est amené à initier une réponse inflammatoire. Il exprime diverses molécules impliquées dans l'immunorégulation, telles que le MHCII, le CD80, ou le CD86. La réponse inflammatoire est dynamique car lorsque le microenvironnement change et que l'inflammation se résout, l'expression de ces molécules diminue. Plusieurs études décrivent le MHCII, le CD80 et le CD86 comme caractéristiques du phénotype des macrophages M1. La présence de ces molécules à la surface des phagocytes traduit leur état d'activation et d'engagement dans la réponse immunitaire (Stables *et al.*, 2011; O'Carroll *et al.*, 2014; Gong, Zhuo and Ma, 2017; Lescoat *et al.*, 2020; Vago *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021). De plus, il a été montré chez l'Homme, que le CD86 est augmenté en surface de macrophages M1 par rapport aux macrophages M2, en conditions basales ainsi qu'en conditions inflammatoires *via* l'infection des cellules par *Mycobacterium tuberculosis* (Mily *et al.*, 2020), mais aussi dans un modèle *in vitro* d'ostéo-arthrite (Mahon *et al.*, 2020; Mily *et al.*, 2020). Dans un modèle murin d'athérosclérose, le même type d'observation a été faite. Les auteurs ont mis en évidence des niveaux augmentés de CD86 et d'iNOS au sein de plaques d'athérome, prônant une polarisation pro-inflammatoire M1 (Gong, Zhuo and Ma, 2017).

iNOS, est le marqueur M1 par excellence (Orecchioni *et al.*, 2019). En effet, la nomenclature M1/M2 proposée en 2000 par Mills et collaborateurs, a mis en lumière la production de NO par les macrophages situés en contexte inflammatoire (Mills *et al.*, 2000). La stimulation microbienne des macrophages *via* les TLRs conduit à l'activation de certains facteurs de transcription, tels que le NF-κB, qui régule à la hausse la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN-γ et le TNF. La conséquence en est la polarisation des macrophages M1 avec une expression élevée d'iNOS. Les macrophages activés importent de l'arginine *via* des transporteurs cationiques, puis la métabolisent *via* l'iNOS, en NO. C'est pourquoi iNOS constitue un marqueur intéressant dans l'identification du phénotype pro-inflammatoire des M1 (Rath *et al.*, 2014).

Il y a peu de temps, une équipe de chercheurs américains a proposé l'utilisation d'un autre marqueur spécifique des macrophages M1 : le **CD38** (Jablonski *et al.*, 2015). Jablonski et son équipe a démontré que les cellules CD38$^+$ sont iNOS$^+$ et que la majorité des M1 iNOS$^+$ co-expriment le CD38.

Bien qu'il n'y ait pas de consensus adopté au regard d'un **phénotype M1** précis, il semble adéquat de définir cette population à travers les marqueurs de surface **F4/80**, **CD11b**, **MHCII**, **CD80**, **CD86**, **iNOS** et **CD38**. Une nuance pourrait être apportée concernant l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86, qui ne sont pas des marqueurs immuables de la mise en place d'une inflammation. En effet, comme cité précédemment, ces molécules ont des pouvoirs co-stimulateurs mais également co-inhibiteurs encore mal connus et discutés (Shapouri - Moghaddam *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2020; Hozain and Cottrell, 2020; Vago *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021).

Enfin, il existe un aspect important à propos des macrophages M1/M2, à partir d'un seul acide aminé qu'ils métabolisent *via* deux voies opposées, ils ne produisent pas les mêmes composés. La préférence des macrophages pour métaboliser l'arginine *via* la NOS en NO et citrulline, ou *via* l'arginase en ornithine et urée, participe à les définir respectivement macrophages M1 ou M2 (Mills, 2012; Rath *et al.*, 2014; Murray, 2016) (**Figure 11**). La NOS ou l'arginase sont des enzymes qui catalysent la transformation de l'arginine, dans une voie plutôt qu'une autre, en fonction de l'environnement cellulaire. Alors que diverses molécules et caractéristiques des macrophages sont exclusivement associées au phénotype M1 *versus* M2, la régulation dichotomique du métabolisme de l'arginine est au centre des différentes fonctions associées aux macrophages M1 et M2 (Rath *et al.*, 2014).

D'autres marqueurs que ceux présents en surface des macrophages aident à différencier les phénotypes établis. C'est le cas notamment des molécules libérées par ces cellules, telles que des cytokines et facteurs de croissance. Les macrophages M1 pro-inflammatoires sont à l'origine de la production de médiateurs de l'inflammation comme l'IL-1α, l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-12, l'IL-23, le TNF le NO et les ROS (Shapouri - Moghaddam *et al.*, 2018; Raziyeva *et al.*, 2021).

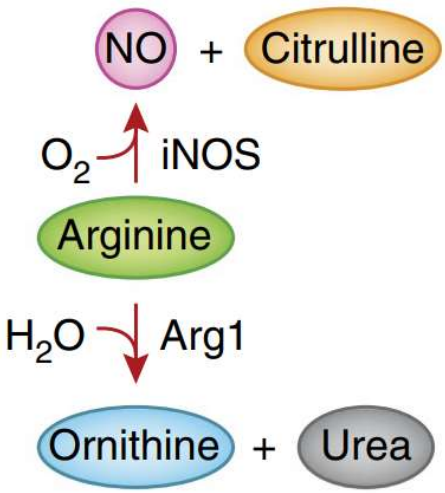


Figure 11 : Représentation simplifiée du métabolisme de l'arginine.
L'arginine est dérivée de la dégradation de protéines cellulaires ou de la production endogène d'arginine de novo. La biosynthèse de l'arginine chez les mammifères implique principalement les acides aminés glutamine, ornithine et citrulline. Les macrophages M1 et M2 partagent la capacité de métaboliser l'arginine. Cela participe à la caractérisation de leurs phénotypes car ces deux types cellulaires ne la métabolisent pas de la même façon. Lorsque les macrophages sont stimulés par du LPS ou de l'IFN-γ, la synthèse de NOS se produit, en l'occurrence iNOS, qui catalyse la réaction permettant la production de NO. Le NO et la citrulline proviennent de la métabolisation de l'arginine par l'iNOS. Les macrophages expriment à la hausse des argininosuccinates, qui recyclent la citrulline produite afin de générer à nouveau de l'arginine. La disponibilité de l'arginine reste une étape limitant la vitesse de synthèse du NO et l'absorption cellulaire de l'arginine détermine également la quantité de NO synthétisé en cas de catalyse par iNOS, ou d'ornithine en cas d'hydrolyse par l'Arg-1. Tandis que les macrophages exprimant l'Arg-1 et produisant de l'ornithine ont été démontré comme cruciaux pour la cicatrisation des plaies. Les macrophages M2 sont alors caractérisés par la production d'Arg-1 par opposition aux macrophages M1 producteurs de NO, qui dominent plutôt la phase initiale de l'inflammation (Murray et al., 2016).

2.3.6. Le phénotype M2 : anti-inflammatoire

Les macrophages M2 sont définis par au moins deux marqueurs, il s'agit d'**Arg-1** et **CD206** (Raes *et al.*, 2005; Martinez and Gordon, 2014; Krzyszczyk *et al.*, 2018). Associées aux marqueurs généraux des macrophages, ces deux molécules permettent de discriminer ce type de macrophages anti-inflammatoire des M1 pro-inflammatoires. L'Arg-1, mentionnée ci-dessus, fut la première molécule exprimée par les M2, mise en évidence suite aux travaux de Mills et collaborateurs en 2000. L'arginase est une enzyme très conservée dans l'évolution des espèces. Elle est d'abord réputée pour sa fonction protectrice dans le cycle de l'urée, agissant contre les excès d'ammoniac en conditions physiologiques. Elle est également connue pour être modulée par de nombreuses cytokines ou facteurs de croissance liés aux processus de cicatrisation comme

le TGF-β, l'IL-4 ou l'IL-13. Le TGF-β est un des activateurs les plus puissants d'Arg-1, localisée dans le cytosol des cellules, principalement des hépatocytes ou des macrophages anti-inflammatoires qui la produisent (Szondi *et al.*, 2021). La fixation de l'IL-4 et l'IL-13 à leurs récepteurs dans le microenvironnement conduit à la phosphorylation du *signal transducer and activator of transcription 6* (STAT-6) et à l'expression consécutive de l'Arg-1 et diverses autres molécules caractéristiques de la polarisation M2, telles que le récepteur au mannose. Dans la réponse immunitaire médiée par les M2, les macrophages produisent de l'ornithine, mais très peu, voire pas du tout de NO. Les macrophages M2 ont une expression élevée d'Arg-1 mais une expression négligeable d'iNOS, qui est régulée par l'IFN-γ (**Figure 11**). La suppression d'Arg-1 est mortelle, car elle a un rôle essentiel dans la régulation du cycle de l'urée (Rath *et al.*, 2014; Murray, 2016).

Le CD206 a également été reconnu comme marqueur spécifique de macrophages impliqués dans la réparation tissulaire. Cette molécule, aussi nommée *mannose receptor C-type 1* pour son rôle de récepteur au mannose, est une glycoprotéine transmembranaire qui se lie et internalise les ligands du collagène (Rőszer, 2015). Il est exprimé par les différents types de macrophages tissulaires, comme les macrophages résidents cardiaques, péritonéaux, du tissu adipeux, *etc.* (Dupasquier *et al.*, 2006; Haase *et al.*, 2014; Svensson-Arvelund *et al.*, 2015). Son expression est amplifiée par l'IL-4, le GM-CSF, le TGF-β et d'autres voies de signalisation indépendantes de l'IL-4/IL-13. Au sein des macrophages résidents des tissus, l'expression de CD206 est maintenue en l'absence de récepteurs à l'IL-4, suggérant que l'environnement tissulaire suffit à maintenir son expression, ou qu'une voie compensatoire à celle médiée par l'IL-4 existe (Dupasquier *et al.*, 2006). D'autres fonctions lui sont attribuées et sont incomplètement comprises. Par exemple, son absence entraîne une augmentation importante de protéines pro-inflammatoires dans la circulation, suggérant qu'il joue un rôle dans la résolution de l'inflammation en inhibant la synthèse de molécules inflammatoires (Lee *et al.*, 2002). De la même façon, son absence *via* la déplétion des macrophages M2, accompagne une augmentation de la migration des macrophages et neutrophiles et entraîne une régulation positive de la production de cytokines pro-inflammatoires au cours d'une inflammation pulmonaire endotoxémique murine (Kambara *et al.*, 2015). Les macrophages exprimant le CD206 peuvent aussi avoir des effets pro-fibrotiques défavorables car ils promeuvent la prolifération des fibroblastes *via* le TGF-β et la sécrétion de CCL18 (Bellón *et al.*, 2011). De plus, de par leur capacité à lier des ligands du collagène, en condition pathologique les M2 peuvent subir un changement phénotypique et devenir des

fibrocytes, eux-mêmes producteurs de collagène qui contribue à la formation du tissu de granulation et à la cicatrisation de la plaie (Medbury *et al.*, 2013). Outre cet effet délétère, ce rôle pro-fibrotique a néanmoins démontré des effets bénéfiques comme dans l'athérosclérose, où les macrophages CD206$^+$ augmentent la stabilité de la plaque d'athérome, lui évitant la rupture (Medbury *et al.*, 2013).

De plus, une étude récente a étayé l'ensemble des propos exposés. Il a été démontré qu'après stimulation par l'IL-4, les niveaux d'expression de CD206 et Arg-1, ainsi que la libération d'IL-10 par les macrophages M2 sont augmentés. Inversement, ce qui caractérise les macrophages M1, comme l'expression de MHCII ou des molécules de co-stimulation, sont réduits (Vago *et al.*, 2020). Malgré cela, il a été démontré que la déficience en MHCII à la surface de macrophages altérait le processus de cicatrisation (Schäffer *et al.*, 2007). Cela implique que le MHCII n'est pas nécessairement un marqueur caractéristique des M2 mais est tout de même nécessaire en phase de résolution de l'inflammation.

L'expression des molécules de classe II ainsi que des molécules de co-stimulation par les M1, leur confère la fonction d'APCs. Les différentes sous-populations de M2, quant à elles, ne les expriment pas nécessairement. Les M2a et M2b par exemple, peuvent exprimer le MHCII, tandis que le CD86 semble n'être exprimé que par les M2b et M2c. Le CD80 n'est pas décrit dans la littérature comme étant un marqueur M2 murin. De plus, les marqueurs caractéristiques des macrophages M2 sont différentiellement exprimés par leurs sous-phénotypes. Les CD206 et Arg-1 seraient exprimés conjointement uniquement par les M2a, alors que le CD206 seul serait exprimé par les M2c ainsi que par un type particulier de macrophages : les macrophages associés aux tumeurs (TAMs pour *tumor-associated macrophages*), correspondant au phénotype M2d (Rőszer, 2015; Krzyszczyk *et al.*, 2018). De façon générale, les macrophages M2 présentent une capacité réduite, par rapport aux M1, dans la présentation des antigènes aux cellules de l'immunité (O'Carroll *et al.*, 2014).

Enfin, l'équipe de Jablonski a proposé l'utilisation d'un nouveau marqueur pour caractériser la population M2, sans distinction des sous-phénotypes. Il s'agit du *early growth response gene 2* (Egr2), un régulateur transcriptionnel connu pour son aptitude à inhiber indirectement la réponse lymphocytaire T *via* l'induction de l'expression des ligands Fas (Mittelstadt and Ashwell, 1999; Safford *et al.*, 2005). En effet, les chercheurs ont démontré *in vitro* que les M2 expriment presque trois fois plus le marqueur Egr2 que le marqueur Arg-1, et que parmi les cellules qui expriment

l'Arg-1 ou le CD206, la plupart d'entre elles co-expriment Egr2. Cela indique alors qu'Egr2 est potentiellement un meilleur marqueur M2 que le sont l'Arg-1 et le CD206 (Jablonski *et al.*, 2015). En accord avec son rôle d'inhibiteur de la réponse lymphocytaire T d'abord identifiée, la pertinence de son utilisation dans un contexte anti-inflammatoire est renforcée (Safford *et al.*, 2005).

D'après l'ensemble de ces observations, il semble alors adéquat de caractériser le **phénotype M2** à l'aide des marqueurs **F4/80**, **CD11b**, **Arg-1** et **CD206** et/ou **Egr2**.

Malgré la concentration d'efforts de scientifiques du monde entier, la biologie d'organismes complexes n'aide guère à trouver un consensus quant à l'établissement de phénotypes précis de ces phagocytes, bien que cela s'explique en partie par la plasticité remarquable dont font preuve les macrophages *in vivo*. Une récente étude a mis en évidence que des macrophages retrouvés au sein d'une plaie, présentent des caractéristiques à la fois des macrophages M1 et M2. Les marqueurs phénotypiques de ces cellules pourraient être régulés de manière différentielle dans l'environnement de la plaie, ou plus généralement dans une zone lésée ou inflammée. Cette observation met en lumière qu'il puisse coexister un phénotype de macrophages qui ne soit pas unique, ni M1, ni M2. Cette découverte va de pair avec le concept émergent selon lequel la classification des macrophages en sous-types M1 et M2 est une simplification excessive qui ne décrit pas de manière parfaite la population de macrophages *in vivo*, en particulier dans des environnements tissulaires, cellulaires et moléculaires complexes (Xu *et al.*, 2021). Les processus de régénération/réparation tissulaire sont également médiés par le *platelet-derived growth factor* (PDGF), l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1), le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et le TGF-β. Le relargage d'IL-10 et de PDGF-β par les M2 associés aux lésions participe au phénomène de réparation épithéliale et la présence de ces cellules au sein d'une zone inflammée a pour conséquence l'inhibition de l'action des MMPs. Ces macrophages inhibent l'inflammation et les cellules immunitaires inflammatoires *via* la sécrétion conjointe de ces molécules : l'IL-10, l'Arg-1 et de TGF-β (Murray and Wynn, 2011; Wynn and Vannella, 2016; Krzyszczyk *et al.*, 2018; Raziyeva *et al.*, 2021).

En résumé, que les macrophages soient de type M1 ou M2, ils sont des sentinelles importantes du système immunitaire. Intégrés dans chaque tissu ou différenciés à partir des monocytes, ils sont sensibles aux changements locaux de leur microenvironnement. Les macrophages tissulaires s'adaptent à leur environnement, quel que soit leur site de différenciation, selon des processus qui leur sont propres et qui sont plus ou moins bien connus. Il est important de comprendre leur rôle dans l'engagement du système immunitaire, bien que cela demeure délicat de par l'hétérogénéité et la complexité de ce type cellulaire (Biswas *et al.*, 2012; Lavin *et al.*, 2014) (**Figure 12**).

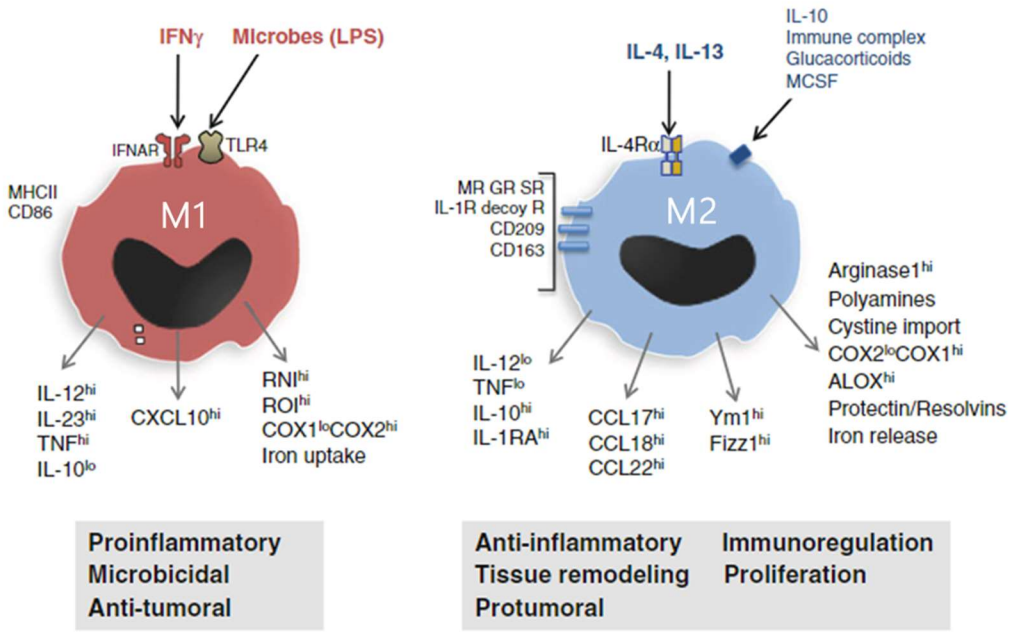


Figure 12 : Représentation schématique des macrophages polarisés M1 et M2.
Les signaux polarisants et les principales caractéristiques moléculaires, métaboliques et fonctionnelles de ces macrophages sont indiqués. IFNAR: interferon-α/β receptor; *RNI: reactive nitrogen intermediates; ROI: oxygen reactive intermediates; COX: cyclooxygenase; MR: mannose receptor; GR: galactose receptor; SR: scavenging receptor; Alox: arachidonate 5-lipoxygenase (figure adaptée à partir de Biswas et al., 2012).*

2.4. Les DCs, APCs professionnelles

2.4.1. Leur découverte par Ralph Steinman et Zanvil A. Cohn

La définition des identités phénotypiques des macrophages s'est davantage compliquée avec la découverte des DCs en 1973, par Ralph Steinman et Zanvil A. Cohn. Ces deux chercheurs ont au départ remarqué la présence d'un type cellulaire possédant de longues projections cytoplasmiques dans la rate et d'autres OLS de souris. Ils ont ainsi proposé de les appeler

« cellules dendritiques » en rapport avec leur morphologie (Steinman and Cohn, 1973; Steinman and Witmer, 1978). Lorsque Ralph Van Furth et Zanvil A. Cohn ont proposé, dans les années 1960, le terme de MPS, celui-ci englobait les macrophages et les monocytes (van Furth and Cohn, 1968). Néanmoins, l'identification des DCs a suscité de nombreux débats parmi les scientifiques, afin de déterminer si ces cellules pouvaient être des constituants du MPS. Il convient de noter que, peu de temps après la découverte de Steinman, Van Furth a incorporé les DCs dans le MPS (van Furth, 1980). Depuis, le MPS n'est plus un système monocytes-macrophages « fermé » comme proposé à l'origine, il englobe maintenant trois grandes familles de cellules, à savoir les DCs dérivées de progéniteurs communs hématopoïétiques, les macrophages issus de l'embryogenèse et les cellules dérivées de monocytes. En 2011, Ralph Steinman a obtenu le prix Nobel de médecine/physiologie pour ses découvertes sur les DCs. Cette récompense a été partagée avec Jules Hoffmann et Bruce Beutler pour leur contribution à la compréhension du système immunitaire inné et la découverte des TLRs.

Depuis la fin du XXème siècle, la recherche dans le domaine des DCs s'est fortement accélérée. Ce n'est que plus tard que la caractérisation de ces cellules a été réalisée, mettant en évidence un partage, avec les macrophages, de plusieurs des mêmes caractéristiques ontogéniques, phénotypiques et fonctionnelles (Geissmann *et al.*, 2010).

2.4.2. Leur ontogénie

Définir à quel stade de leur développement les DCs proviennent d'autres lignées cellulaires immatures, fait encore aujourd'hui l'objet de débats. Cependant, il existe des preuves suggérant que cela peut se produire à un stade relativement précoce de l'hématopoïèse et il est clair qu'elles proviennent de précurseurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse (Naik *et al.*, 2013; Bigley and Collin, 2020). C'est à partir d'HSCs, puis de progéniteurs communs aux DCs, qui sont issus de la lignée myéloïde, que ces cellules se différencient. Elles peuvent se différencier aussi à partir des monocytes et sont, par conséquent, sous le contrôle de facteurs de transcription et cytokines différentes (**Figure 1**).

Malgré les avancées technologiques considérables depuis la découverte des DCs, la compréhension de leur développement est fortement dérivée de modèles animaux ou d'expériences *in vitro*, faute de données provenant d'études menées chez l'Homme. Le processus de différenciation des DCs à partir de leurs précurseurs hématopoïétiques dépend de la cytokine

Feline McDonough Sarcoma-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3L) (**Figure 13**). En effet, en conditions homéostatiques, les souris dépourvues des gènes *Flt3L* ou *Flt3* montrent une absence importante de sous-ensembles de DCs (McKenna *et al.*, 2000; Waskow *et al.*, 2008). L'injection de Flt3L chez la souris augmente la fréquence et la diversité des différents sous-ensembles de DCs (Maraskovsky *et al.*, 1996). Le GM-CSF est une autre cytokine importante pour la survie des DCs. Bien que les souris déficientes en GM-CSF (GM-CSF$^{-/-}$) présentent un niveau similaire de DCs lymphoïdes résidentes à celles des souris *wild type* (WT), les souris déficientes pour le récepteur au GM-CSF (GMCSF-R$^{-/-}$) présentent, en conditions homéostatiques, une fréquence de DCs trois fois moindre (Vremec *et al.*, 1997). Cette observation chez les souris GMCSF-R$^{-/-}$ pourrait être due à l'absence de chaîne bêta partagée par les récepteurs à l'IL-3 ou à l'IL-5. Inversement, la surexpression de GM-CSF chez les animaux a augmenté la fréquence des DCs dans la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques (Vremec *et al.*, 1997).

Les HSCs se différencient en progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes qui ont le potentiel de se développer en lignées myéloïdes et lymphoïdes. La cinétique de différenciation veut qu'à partir de monocytes, puissent se différencier des macrophages, ou des DCs (Doulatov *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017). Les DCs issues des monocytes sont nommées *monocyte-derived dendritic cells* (MoDCs) (**Figure 1**). À partir des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes communs, émergent les trois sous-ensembles de DCs : les DCs plasmacytoïdes (pDCs), et les pré-cDCs qui se différencient ensuite en DCs conventionnelles (cDCs) (See *et al.*, 2017) (**Figures 1 et 13**).

L'hétérogénéité des DCs provient d'une diversification intrinsèque à leur lignée au cours de l'hématopoïèse, puis lors des processus de recrutement et migration de celles-ci. C'est-à-dire que ces cellules sont orientées vers des fonctions associées à un phénotype, dépendamment des facteurs de transcriptions et cytokines par lesquelles elles sont régies.

2.4.3. Les divers phénotypes attribués aux DCs

Les premières études sur la biologie des DCs se limitaient principalement aux MoDCs générées *in vitro*. Le développement de mAb et l'identification de marqueurs de surface cellulaire caractéristiques des DCs les ont défini comme un sous-ensemble de cellules exprimant des niveaux élevés de **MHCII** et de **CD11c**, une intégrine de la famille β2 (Steinman and Witmer, 1978; Metlay *et al.*, 1990). Le CD11c est exprimé par toutes les DCs murines et certains sous-ensembles de DCs humaines. C'est une protéine transmembranaire connue sous le nom d'intégrine αX. Alors

que ses fonctions au sein des DCs ne sont pas très bien caractérisées, un de ses rôles potentiels a été rapporté il y a peu de temps. CD11c possède une fonction dans la liaison et l'absorption de cellules CD47$^-$ (Wu *et al.*, 2018). Connu sous le nom de marqueur « *don't eat me* », CD47 est une protéine de surface cellulaire abondamment exprimée par la plupart des types de cellules. L'engagement du CD47 de par sa liaison au récepteur *signal regulatory protein α* (SIRPα) présent à la surface des phagocytes, transmet un signal inhibiteur de phagocytose (Barclay and Van Den Berg, 2014). CD47 est surtout réputé pour être surexprimé dans divers cancers comme dans les leucémies ou les lymphomes, permettant ainsi aux cellules tumorales d'échapper à l'ingestion par les cellules du MPS (Jaiswal *et al.*, 2009; Chao *et al.*, 2010). Le MHCII et le CD11c ont permis une caractérisation du phénotype et de la biologie des DCs et offrent, encore aujourd'hui, la possibilité d'identifier les DCs parmi d'autres cellules du MPS. Au début du XXIème siècle, il a également été rapporté que les DCs murines pouvaient être divisées en deux sous-groupes sur la base de l'expression des marqueurs de LT classiques, le CD8 et le CD4 (Vremec *et al.*, 2000). De plus, une façon complémentaire de discriminer un type cellulaire peut être l'utilisation de marqueurs qui ne sont pas exprimés par les cellules en question. Ainsi, identifier les DCs *via* l'exclusion d'un certain nombre de marqueurs, comme le CD3 ou CD19 par exemple, contribue à les discriminer parmi d'autres types de cellules de l'immunité (Collin and Bigley, 2018).

Les DCs sont des cellules très hétérogènes, qui auparavant, étaient classées de diverses manières :

- Selon leur origine, myéloïde ou lymphoïde,
- Selon l'expression de différentes molécules de surface, Selon la localisation tissulaire des DCs, avec une distinction entre les DCs résidentes et les DCs migratoires. Les DCs résidentes étaient d'ailleurs nommées « DCs résidentes lymphoïdes » car elles restaient dans les organes lymphoïdes durant tout leur cycle de vie et présentaient un phénotype immature, avec un niveau d'expression de MHCII assez faible,
- Selon l'expression par les cellules de molécules de co-stimulation, définissant leur statut immature ou mature. Enfin,
- Selon la fonctionnalité et le profil cytokinique qui accompagnent les DCs, à savoir, si celles-ci sont plutôt tolérogènes ou immunogènes (Balan, Saxena and Bhardwaj, 2019).

À ce jour, la classification des DCs est basée sur une approche intégrée, prenant en compte à la fois leur ontogénie, leurs phénotypes, leurs signatures génétiques, leur capacité à porter diverses molécules fonctionnellement utiles, telles que des TLRs ou des récepteurs aux chimiokines. Enfin,

l'hétérogénéité des DCs est affinée par leur localisation anatomique (Guilliams *et al.*, 2014). Les DCs sont alors classées en fonction de :

- S'il s'agit de « DCs homéostatiques », comprenant
  - Les cDCs, ou,
  - Les pDCs.

  Les sous-ensembles de « DCs homéostatiques » murins expriment l'intégrine CD11c à leur membrane, tandis que chez l'Homme, les cDCs l'expriment, mais pas les pDCs. Quelle que soit l'espèce, la différenciation des cDCs et des pDCs dépend de la cytokine Flt3L (Mildner and Jung, 2014).
- S'il s'agit de DCs inflammatoires/immunogènes,

  Il est maintenant admis que les DCs inflammatoires sont absentes en conditions homéostatiques, c'est pourquoi l'ensemble des DCs, dites « homéostatiques », est nommé ainsi. À l'état physiologique, seules les cDCs et pDCs sont produites. Les MoDCs proviennent des précurseurs monocytaires et ne sont présentes que lorsqu'elles sont recrutées lors de la survenue d'une inflammation (Segura and Amigorena, 2013; Ginhoux and Jung, 2014) (**Figure 13**),
- S'il s'agit des cellules de Langerhans (LCs) peuplant l'environnement cutané. Ce type cellulaire est un peu particulier car au départ, il été classé parmi les DCs, puis a ensuite été caractérisé comme macrophagique. Dans nombre de publications, les LCs sont encore classées comme DCs, illustrant la limite très fine entre ces deux types cellulaires (Balan, Saxena and Bhardwaj, 2019). En effet, elles ont un phénotype et des fonctions communes aux DCs, mais aussi aux macrophages, comme le fait qu'elles possèdent une origine embryonnaire, ainsi qu'une capacité d'auto-renouvellement (Merad *et al.*, 2013).

2.4.3.1. Les cDCs

Les cDCs comprennent deux catégories de cellules aux phénotypes et fonctions différentes, les cDC1 et cDC2.

2.4.3.1.1. Les cDC1

Le processus de différenciation des cDC1 est contrôlé par une combinaison de facteurs de transcription, dont l'*interferon regulatory factor 8* (IRF8), l'*inhibitor of DNA binding 2* (ID2) et le b*asic leucine zipper ATF-like transcription factor 3* (BATF3) (Aliberti *et al.*, 2003; Grajales-Reyes *et*

al., 2015; Chandra *et al.*, 2017). Les cDC1 murines sont identifiées par l'expression de différents marqueurs, tels que le MHCII, le CD11c, mais également le CD8α ou le CD103 ; ou *via* l'absence d'expression de CD11b et B220. L'expression du CD11c peut varier selon les tissus ou organes dans lesquels sont retrouvées les DCs. L'expression du CD8α par les cDC1 est généralement observée dans des populations de DCs résidentes lymphoïdes, comme c'est le cas des DCs présentes dans la rate (Shortman and Heath, 2010; Guilliams *et al.*, 2016) (**Figure 13**). Le CD103 est un marqueur des cDC1 particulier. En effet, celui-ci n'est pas exprimé par les cellules présentes dans les tissus lymphoïdes, mais il est généralement exprimé par les cDC1 lorsqu'elles se situent dans des tissus non-lymphoïdes, comme le foie, les reins ou les poumons par exemple. C'est pourquoi ce marqueur est souvent utilisé afin d'identifier les DCs migratoires. (Sung *et al.*, 2006; Ginhoux *et al.*, 2009; Edelson *et al.*, 2010) (**Figure 13**). Une autre des particularités des cDC1 est de ne pas exprimer le F4/80, CD11b et SIRPα (Guilliams *et al.*, 2016). Enfin, à l'image des cDC1 humaines, les cDC1 murines expriment des marqueurs uniques, tels que Clec9a (*C-type lectin receptor 9a*), CADM1 (*cell adhesion molecule 1*), et XCR1 (*C motif chemokine receptor 1*) (Crozat, Guiton, Guilliams, *et al.*, 2010; Shortman and Heath, 2010). La présence de Clec9a sur les cDC1 facilite la phagocytose des cellules nécrotiques et apoptotiques, ainsi que la *cross*-présentation d'antigènes aux LT $CD8^+$ (Sancho *et al.*, 2009; Schreibelt *et al.*, 2012). Cependant, contrairement aux cDC1 humaines, chez la souris Clec9a est exprimé à la fois par les progéniteurs cDCs et les pDCs (Schraml *et al.*, 2013). CADM1, également nommée Necl2 (*Nectin-like 2*), est, quant à elle, exprimée par les cDC1 chez différentes espèces et permet leur interaction avec les cellules NK et les LT $CD8^+$ activés (Arase *et al.*, 2005). Enfin, les ligands de XCR1 (XCL1/2) sont exprimés par les LT $CD8^+$ mémoires et les NK (Crozat, Guiton, Contreras, *et al.*, 2010). La présence de ce récepteur sur les cDC1 favorise leur interaction avec ces cellules effectrices. Fait intéressant, les cDC1 présentent une expression bimodale de XCR1. Une fraction de cDC1 retrouvée dans la circulation sanguine ou au niveau de la peau n'exprime pas XCR1 et représente alors un état immature de ces cellules (Granot *et al.*, 2017; Balan *et al.*, 2018). Ces cDC1 $XCR1^-$ peuvent néanmoins proliférer et acquérir l'expression de XCR1 (Balan *et al.*, 2018).

2.4.3.1.2. Les cDC2

La différenciation des cDC2 est majoritairement dépendante de la régulation transcriptionnelle médiée par IRF4, comparée à celle des cDC1, dépendante d'IRF8, BATF3 et ID2 (Pool, Rivollier and Agace, 2020). Comme les cDC1, les cDC2 expriment le CD11c, MHCII et le CD103 dans les organes non lymphoïdes et ne portent pas le F4/80 à leur surface. Cependant, *a contrario* des cDC1, les cDC2 expriment fortement SIRPα et le CD11b (**Figure 13**). Elles expriment également le marqueur CD1c. Enfin, les cDC2 sont négatives pour les marqueurs caractéristiques des cDC1, tels que CD8α, Clec9a et XCR1 (Balan, Saxena and Bhardwaj, 2019). D'autres marqueurs caractéristiques des cDC2 sont Clec12a et l'ESAM (*endothelial cell-specific adhesion molecule*), qui sont notamment retrouvés sur les cDC2 spléniques. Ces deux marqueurs sont exprimés de façon complémentaire, c'est-à-dire que, les cDC2 sont soit Clec12a^{low} ESAM^{high}, soit, Clec12a^{high} et ESAM^{low}. Les cDC2 ESAM^{high} présentent une homologie avec les cDC2 humaines et les cDC2 ESAM^{low} présentent une forte similarité avec les MoDCs (Lewis *et al.*, 2011; Balan, Saxena and Bhardwaj, 2019).

Un cas particulier de cDC2 a été rapporté. En effet, Sheng et collaborateurs ont mis en lumière une population discrète de cDC2 dérivée de monocytes, aux capacités migratoires, possédant un phénotype macrophagique (F4/80^{+}), mais avec les caractéristiques fonctionnelles des DCs (APCs professionnelles) (Sheng *et al.*, 2017). Cet exemple illustre une fois de plus la frontière très fine qui existe entre les macrophages et les DCs, qui partagent certaines étapes des voies de développement et diverses caractéristiques.

À ce jour, il n'existe pas de modèle murin où les cDC2 sont délétées et en raison du manque de tels outils, la compréhension de la biologie des cDC2 reste incomplète.

2.4.3.2. Les pDCs

Le développement des pDCs est essentiellement dépendant du facteur de transcription E2.2, mais aussi et surtout d'un équilibre entre E2.2 et ID2 (Seillet and Belz, 2013). Les pDCs diffèrent des autres sous-types de DCs de par leur morphologie similaire à celles des plasmocytes producteurs d'anticorps et leur expression d'un marqueur commun, le B220 (Grouard *et al.*, 1997) (**Figure 13**). Les pDCs ne comportent pas de prolongement ni de dendrite, qui sont pourtant des caractéristiques spécifiques aux DCs (Balan, Saxena and Bhardwaj, 2019). Les pDCs sont caractérisées par leur grande capacité à produire de l'IFN de type I (α principalement), participant

ainsi à l'immunité antivirale. C'est parce que ce type de DCs est réputé pour son efficacité à produire de l'IFNα, que ça lui a valu pour première appellation après sa découverte dans les années 1950, « cellules productrices d'IFN ». Ensuite, son surnom est devenu « cellules plasmatiques » en référence à sa ressemblance avec les plasmocytes, pour enfin devenir « cellules plasmacytoïdes » en ajoutant à l'homologie morphologique, que les pDCs expriment, comme les cDCs, le récepteur au Flt3, dont leur développement dépend et partage un progéniteur hématopoïétique commun (Schmid and Manz, 2010; Swiecki and Colonna, 2016; Reizis, 2019). De plus, il a été observé que l'IFN de type I régule à la hausse Flt3 chez les progéniteurs lymphoïdes communs et participe ainsi à la différenciation des pDCs (Chen *et al.*, 2013).

Ce type de DCs exprime des niveaux très élevés de MHCII. Il exprime également le CD11c, BST2 (*bone marrow stromal cell antigen 2*) et SiglecH (*sialic acid binding Ig-like lectinH*) et n'exprime pas les marqueurs comme XCR1, caractéristique des cDC1, ni SIRPα ou CD11b, caractéristiques, entre autres, des cDC2. À noter toute de même, qu'il existe des sous-populations de pDCs qui expriment de manière différentielle les CD4 et CD8 (O'Keeffe *et al.*, 2002). Par exemple, dans la rate les pDCs expriment de faibles niveaux de CD8. Les pDCs migratoires peuvent exprimer des marqueurs supplémentaires, tels que CCR9 (Swiecki and Colonna, 2016). Enfin, les pDCs murines expriment des niveaux élevés de TLR-7 et -9 (Swiecki and Colonna, 2016)

2.4.3.3. Les DCs inflammatoires ou MoDCs

Les DCs inflammatoires, ou MoDCs, proviennent de précurseurs de monocytes. Ces cellules sont recrutées lors d'une infection ou d'une lésion grâce à la production de cytokines et de chimiokines. Il est possible que les MoDCs soient peu discernables des macrophages tant leurs ressemblances phénotypiques sont importantes. En effet, les MoDCs expriment des niveaux élevés de MHCII et différentes molécules co-stimulatrices, telles que le CD80 et le CD86. Elles expriment d'autres marqueurs macrophagiques, tels que le F4/80, le CD11b ou le CD206 (Segura and Amigorena, 2013). Le marqueur pouvant aider à différencier phénotypiquement les macrophages des MoDCs est le CD11c, caractéristique de la classe cellulaire des DCs. Malgré cela, distinguer les MoDCs des macrophages reste un défi majeur.

Comme d'autres sous-ensembles de DCs, les MoDCs peuvent être retrouvées dans n'importe quel tissu lors d'une réponse inflammatoire car elles sont capables de migrer vers les organes lésés, mais aussi vers les ganglions lymphatiques drainants (Qian and Cao, 2018) (**Figure 13**). Leur

capacité migratoire vers les OLS est dépendante de CCR2. Il a été démontré que des animaux déficients en CCR2 présentent une réduction spectaculaire de la fréquence des MoDCs. Alors que les souris déficientes en Flt3L ne montrent aucune différence importante dans la fréquence des MoDCs. Cela confirme alors qu'elles n'appartiennent pas à la lignée de DCs classiques (Nakano *et al.*, 2009, 2013). Pour autant, les MoDCs n'échappent pas à l'aptitude majeure définissant les DCs, à savoir, exercer la fonction d'APCs (Balan, Saxena and Bhardwaj, 2019). Plusieurs études ont démontré la capacité des MoDCs à présenter des antigènes et à activer les LT $CD4^+$. Ces observations ont été confirmées dans un modèle murin $CCR2^{-/-}$ d'infection par *Aspergillus fumigatus*, où la déplétion de CCR2 altère la présentation d'antigènes aux LT $CD4^+$, ainsi que la détersion de ce champignon dans les poumons, son organe cible (Hohl *et al.*, 2009). D'ailleurs, en plus de présenter un phénotype similaire aux macrophages, les MoDCs possèdent un phénotype proche de celui des cDC2, avec des niveaux élevés de MHCII, CD11c et CD11b. Enfin, les MoDCs sont capables de produire différentes cytokines telles que l'IL-1, l'IL-12 et l'IL-23 (Balan, Saxena and Bhardwaj, 2019).

Il semblerait qu'il y ait des contributions différentes des cDCs et des MoDCs dans l'amorçage de l'immunité adaptative, qui demeurent incomplètement comprises. Des données suggèrent que ces cellules se divisent le travail, les cDCs interagiraient avec les LT naïfs et initieraient la réponse adaptative, tandis que les MoDCs fourniraient des signaux cytokiniques et chimiokiniques cruciaux pour la polarisation ou la stabilisation des LT (Plantinga *et al.*, 2013; Schreiber *et al.*, 2013). Chez les rongeurs présentant une altération du recrutement des cDCs et des MoDCs tissulaires en raison d'un déficit en CCL19/CCL21, il a été observé que les MoDCs provenant des ganglions lymphatiques, compensent l'effet des cDCs dans l'activation des LT naïfs (Nakano *et al.*, 2009).

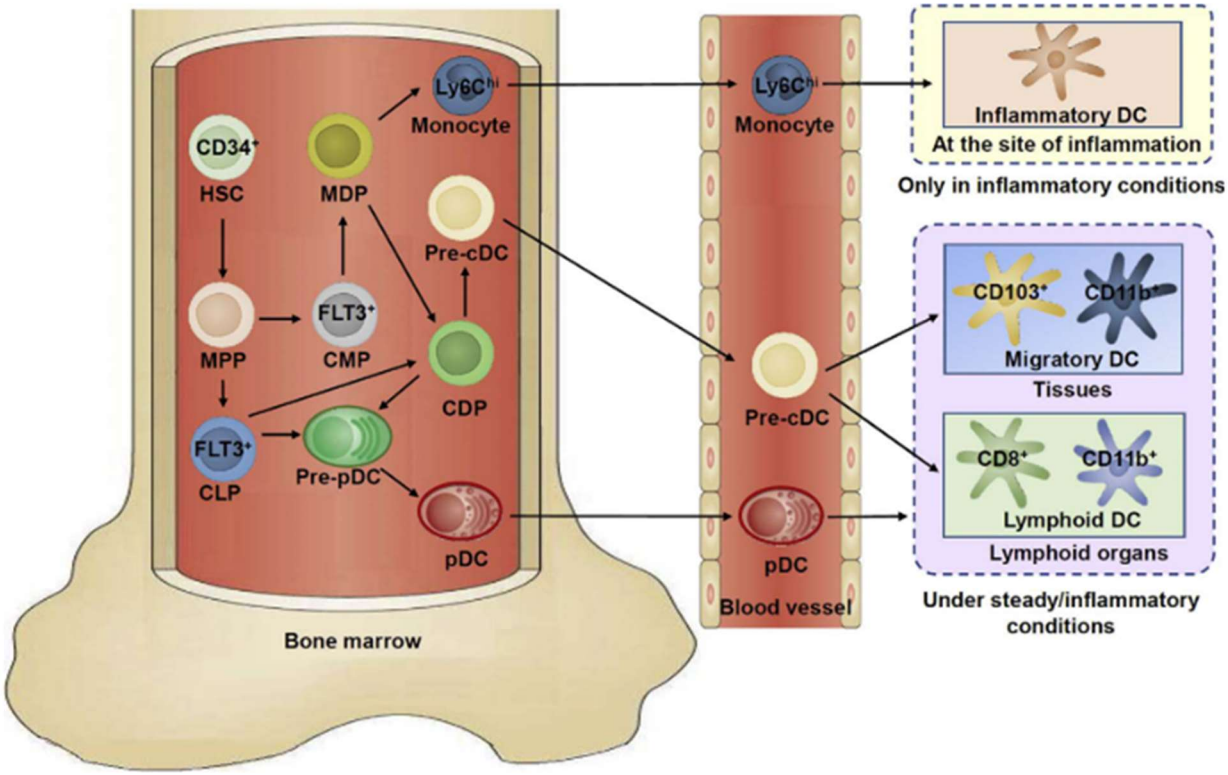


Figure 13 : Représentation simplifiée de l'origine, la distribution et la migration des sous-types de DCs murines. *Dans la moelle osseuse, les HSC (CD34⁺) donnent naissance à des progéniteurs myéloïdes communs (CMP) ou à des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) via des progéniteurs multipotents (MPP). Les CMP Flt3⁺ se différencient en progéniteurs de DCs de type granulocytes-macrophages (MDP), qui donnent ensuite naissance à des monocytes et à des progéniteurs de DCs communs (CDP). Les CDP se différencient à leur tour en précurseurs de cDCs (pré-cDC) et en précurseurs de pDCs (pré-pDC). Les pré-pDCs peuvent également se différencier des CLP Flt3⁺ et donner naissance à des pDCs matures dans la moelle osseuse. Les MDP peuvent se différencier en monocytes exprimant des niveaux élevés du marqueur Ly6C (marqueur monocytaire murin) dans la moelle osseuse. Les pré-cDCs, les monocytes Ly6C^{high} et les pDCs transitent via la circulation sanguine vers les organes périphériques, où ils peuvent modifier leur phénotype et leur fonction selon des signaux environnementaux locaux. Les DCs inflammatoires, ou MoDCs, se différencient à part des monocytes Ly6C^{high} uniquement lors de l'inflammation. Une fois sur place, les pré-cDCs subissent une dernière étape de différenciation qui génère des DCs migratrices CD103⁺ et CD11b⁺ dans les tissus et des DCs lymphoïdes CD8α⁺ et CD11b⁺ dans les organes lymphoïdes (Qian and Cao., 2018).*

2.4.4. La fonction majeure des DCs : la présentation d'antigènes

Lorsque Steinman et Cohn ont décrit ce nouveau type cellulaire, les DCs, sa fonction demeurait obscure. Au cours des années 1970, Steinman et Margaret Witmer ont observé pour la première fois la capacité de ces cellules à activer des cellules de l'immunité adaptative (Steinman and Witmer, 1978). Ensuite, c'est au début des années 1990 que Steinman a mis en évidence la motilité de ces cellules ainsi que leur aptitude à dégrader et présenter des antigènes à la surface des molécules du MHCI et MHCII, activant efficacement les LT (Steinman, 1991) (**Figure 10**).

Les DCs ne sont pas exclues des catégories de cellules présentant une racine commune, sans pour autant exercer des fonctions identiques. Alors que les macrophages sont des phagocytes spécialisés dans l'élimination des microorganismes, ils font également partie de la catégorie des APCs, comme mentionné précédemment. Ainsi, les DCs sont les cellules les plus compétentes dans la présentation des antigènes car ce sont les plus efficaces pour activer des lymphocytes T, et donc initier une réponse immunitaire adaptative (Mellman and Steinman, 2001).

Les macrophages présentent la particularité de phagocyter à grande échelle, ainsi que d'exercer la fonction d'APCs à plus petite échelle. Les M1 et les M2, qui sont des macrophages, n'ont pour autant pas les mêmes fonctions intrinsèques. Les DCs quant à elles, représentent également un grand groupe de cellules de l'immunité innée, étant assez complémentaire à celui des macrophages. En effet, elles ont une capacité de phagocytose faible, tandis qu'elles sont d'excellentes APCs.

Les DCs, à l'état immature, sont retrouvées en faible nombre dans tous les tissus. Les DCs, et notamment les cDCs, sont des cellules à haut potentiel migratoire, elles sont principalement présentes en tant que sentinelles dans les tissus et migrent vers les OLS au niveau des « zones T » et « zones B » lorsque des signaux inflammatoires leurs sont adressés. C'est après un contact avec des agents étrangers, qu'elles engagent un processus de maturation, migrent dans les OLS à la rencontre des LT naïfs et expriment des taux importants de molécules de co-stimulation. Les LT naïfs activés par les DCs matures se différencient ensuite en LT effecteurs (Mellman and Steinman, 2001). Chez l'Homme, les DCs peuvent être retrouvées circulantes dans le sang, tandis que chez la souris elles sont plus rares.

2.4.4.1. L'importance des molécules du MHCII et de co-stimulation

Le MHCII est nécessaire pour la présentation d'antigènes exogènes aux LT $CD4^+$ et la présence de molécules co-stimulatrices à leur surface fait état de leur statut de maturation, important pour l'initiation d'une réponse immunitaire effectrice. Il est intéressant de noter qu'il existe une régulation d'expression des molécules de classe II entre les macrophages et les DCs (Buxadé *et al.*, 2018). En effet, cette régulation de l'expression de MHCII en surface des macrophages, les distinguent des DCs, qui les expriment à des niveaux beaucoup plus importants, que ce soit en conditions basales ou en conditions inflammatoires. À cet égard, il est possible que les macrophages et les DCs partagent des mécanismes transcriptionnels communs, contrôlant le

MHCII. En effet, l'expression du MHCII est sous le contrôle du *class II transactivator* (CIITA), lui-même sous l'influence du *nuclear factor of activated T cells* 5 (NFAT5). Cette voie de signalisation participant à l'expression du MHCII est commune aux deux types cellulaires (Buxadé *et al.*, 2018).

La famille de molécules B7 est impliquée dans la régulation des fonctions d'activation et de survie des LT. La liaison de CD80 et CD86 au CD28 sur les LT est essentielle pour l'activation, la prolifération, la production de cytokines par les LT et par conséquent, éviter aux LT d'entrer dans d'un état anergique (Sansom, 2000). Les molécules B7 peuvent également lier CTLA-4 sur les cellules T et inhiber leurs fonctions. Cet axe est critique dans la régulation des LT. Les modèles murins où CTLA-4 est déplété présentent une forte réponse auto-immune et des troubles lymphoprolifératifs (Tivol *et al.*, 1995; Waterhouse *et al.*, 2011). Une autre molécule co-stimulatrice importante portée par les DCs est le CD40. C'est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la superfamille du TNF. Le ligand du CD40, le CD40L (ou CD154) est généralement exprimé par les LT $CD4^+$ et $CD8^+$ activés (O'Sullivan and Thomas, 2003). L'interaction CD40-CD40L régule à la hausse l'expression des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 et induit la maturation complète des DCs. Lorsque la liaison de CD40-CD40L est engagée, la production d'IL-12 par les DCs est engendrée, ce qui conduit à la polarisation des LT naïfs en Th1 (O'Sullivan and Thomas, 2003). Une autre glycoprotéine membranaire, le CD83, membre de la superfamille des IgG, est également considéré comme un marqueur représentatif de l'état de maturation des DCs. Ainsi, il est exprimé par les DCs matures (Lechmann *et al.*, 2002). Fait intéressant, il a été rapporté que la forme soluble de CD83 impactait négativement la maturation des DCs ainsi que la prolifération des cellules T, générée par les DCs (Lechmann *et al.*, 2002). Cette donnée, associée aux modèles murins dans lesquels le CD83 est déficient, montre une réduction marquée des LT $CD4^+$ dans la circulation sanguine. Cela sous-tend un rôle important du CD83 pour le développement des LT et suggère que sa présence à la membrane des DCs est primordiale pour induire l'activation des LT (Fujimoto *et al.*, 2002; García-Martínez *et al.*, 2004). Ainsi, l'expression de molécules co-stimulatrices sur les APCs est cruciale pour déterminer la nature et l'étendue de la réponse immunitaire.

En somme, la réponse immunitaire débute avec la présentation d'un antigène, présent sur le MHCII d'une APC, à un lymphocyte T $CD4^+$. Cette interaction sollicitant les MHCII-peptide-*T cell receptor* (TCR) constitue le premier signal d'activation (**Figure 14**). La responsabilité d'engagement du second signal revient aux molécules de co-stimulation : notamment les molécules CD80 et

CD86. L'une ou l'autre de ces deux molécules vont interagir avec le CD28 en surface des LT. Le cumul des signaux un et deux constitue la synapse immunologique (**Figure 14**). L'interaction des APCs et LT *via* les MHCII-peptide-TCR et l'engagement des signaux de co-stimulation a pour retentissement la libération dans le microenvironnement cellulaire de cytokines et chemokines, constituant un troisième signal de co-activation. L'ensemble de ces phénomènes et notamment, l'association des signaux un et deux, induit une activation des LT CD4$^+$ spécifiques de l'antigène ; ainsi qu'un recrutement de LT *helpers*. Si l'un des deux premiers signaux de co-signalisation n'est pas présent, les LT entreront en anergie, c'est-à-dire dans un état de non-réponse spécifique induit par une stimulation antigénique antérieure non accompagnée des signaux de co-stimulation. Le lymphocyte T n'est pas éliminé, mais fonctionnellement inactivé, anergisé, il devient tolérisé (Wing, Tay and Sakaguchi, 2019).

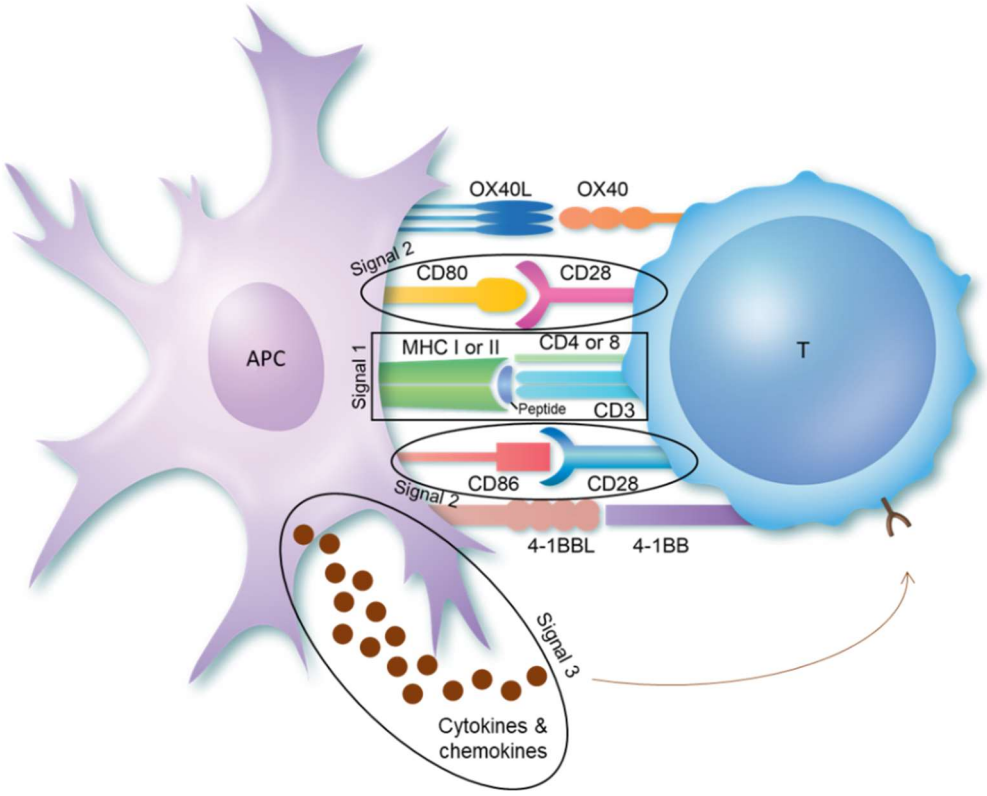


Figure 14 : La synapse immunologique, site d'activation des lymphocytes T.
Signal 1 : la cellule T rencontre une APC portant un peptide antigénique sur une molécule du MHC. Le LT se lie alors au MHC-peptide via son TCR (CD3$^+$ CD4$^+$ ou CD3$^+$ CD8$^+$). Signal 2 : les molécules de co-stimulation CD80 ou CD86, entre autres, se lient au CD28 présent sur la cellule T. Signal 3 : la libération de cytokines et chémokines dans l'environnement cellulaire est permise grâce aux deux premiers signaux. L'ensemble de ces trois signaux induit une activation complète, une prolifération et une fonction effectrice de la cellule T ainsi qu'un recrutement supplémentaire des cellules immunitaires (figure adaptée de British Society for Immunology : https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/systems-and-processes/t-cell-activation).

Diverses études tendent à dire que le CD80 aurait un rôle plus important dans l'interaction avec CTLA-4, tandis que le CD86 serait le ligand dominant pour l'induction de réponses T *via* le CD28 (Sansom, Manzotti and Zheng, 2003; Wing, Tay and Sakaguchi, 2019). Outre ces observations, il ne faut pas négliger que le résultat fonctionnel de la stimulation des LT, dépendra de façon cruciale du contexte ; à savoir, du type d'APC engagée, de l'intensité des signaux TCR, des niveaux d'expression des molécules de co-stimulation, de la présence d'adjuvants, ainsi que de l'environnement moléculaire et cellulaire selon l'antigène (Sansom, Manzotti and Zheng, 2003).

2.4.4.2. Fonction des cDC1 dans la *cross*-présentation d'antigènes et la réponse anti-tumorale

Les cDC1 sont réputées pour leur aptitude à activer les LT CD8$^+$ par *cross*-présentation des antigènes (**Figure 15**). En effet, diverses études basées sur des modèles animaux ont démontré la capacité supérieure de ce sous-type cellulaire, par rapport aux autres APCs, à exercer la présentation croisée d'antigènes, provenant notamment de cellules mourantes. C'est grâce à leur expression de Clec9a, ainsi que de la protéine RAB43, impliquée dans le trafic vésiculaire au sein des endosomes, que cette capacité leur est attribuée (Vu Manh *et al.*, 2015; Kretzer *et al.*, 2016; Cancel *et al.*, 2019).

Les cDC1 sont aussi impliquées dans les réponses anti-tumorales. En effet, l'utilisation de souris déficientes en BATF3, molécule clef du phénotype cDC1, a démontré son importance, puisque les animaux étaient alors incapables de développer une réponse anti-tumorale (Hildner *et al.*, 2008). De plus, un modèle murin de vaccination avec l'antigène OVA a étayé l'importance et donc, le rôle des cDC1 dans la lutte contre les tumeurs, car cette vaccination a permis de contrôler la croissance tumorale (Sancho *et al.*, 2008). L'interaction de XCR1, autre molécule signature des cDC1, avec son ligand principal XCL1, fournit un système de modulation de la réponse immunitaire. L'axe XCR1-XCL1 permet d'établir un dialogue entre les LT CD8$^+$ du système immunitaire adaptatif et les cellules NK de l'immunité innée. Cela indique qu'à travers l'expression de XCR1, les cDC1 sont essentielles dans la réponse anti-tumorale. De plus, les cDC1 sécrètent de l'IL-15, une cytokine cruciale pour l'activation et la prolifération des NK, indiquant l'interaction physiologiquement pertinente entre ces sous-ensembles cellulaires (Pilones *et al.*, 2020). Globalement, les cDC1 possèdent un rôle critique dans la capture d'antigènes tumoraux, leur transport vers les ganglions lymphatiques, leur présentation aux cellules T CD8$^+$ et dans l'induction d'une immunité anti-tumorale (Roberts *et al.*, 2016). D'autres fonctions sont attribuées

aux cDC1, comme par exemple celui de moduler les pDCs. Il s'avère que les cDC1 ont la capacité de produire de l'IFN de type III (IFN-λ) et que les pDCs portent le récepteur à l'IFN-λ. Ainsi, les cDC1 peuvent interagir avec les pDCs, ou les activer (Megjugorac, Gallagher and Gallagher, 2009). Une étude *in vitro* a montré que le pré-traitement des pDCs avec de l'IFN de type III peut améliorer leur viabilité et augmenter la production d'IFN de type I (Finotti *et al.*, 2016). Ce sous-ensemble de DCs s'avère essentiel pour l'induction de réponses immunitaires contre différentes espèces bactériennes (*Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* et le BCG), ainsi que pour le recrutement de neutrophiles au site d'infection (Janela *et al.*, 2019).

2.4.4.3. Fonction des cDC2 dans l'interaction avec les LT CD4$^+$

Les cDC2 constituent une population de DCs exprimant un large éventail de TLRs et sont ainsi capables de répondre à une variété de PAMPs/DAMPs, allant des nucléotides aux polysaccharides. Ils expriment également des niveaux élevés de NLRs et d'autres molécules de signalisation associées à l'inflammation, par rapport aux autres sous-ensembles de DCs à l'état basal, suggérant une spécialisation fonctionnelle pour détecter différents signaux de danger (Balan, Saxena and Bhardwaj, 2019). Elles sécrètent généralement un niveau élevé de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-6 ou l'IL-8 et possèdent un phénotype mature, c'est-à-dire MHCII^{high}, lorsqu'elles se trouvent dans les ganglions lymphatiques (Granot *et al.*, 2017). Les cDC2 sont aussi associées à la présentation d'antigènes aux cellules T CD4$^+$. Ces cellules peuvent produire de l'IL-1β ou de l'IL-23 en réponse aux agonistes des TLRs et peuvent induire des réponses Th1 et Th17 (Leal Rojas *et al.*, 2017) (**Figure 15**). À noter que, les cDC2 humaines et murines sont les principales cellules productrices d'IL-23, favorisant les réponses lymphocytaires Th17 lors d'infections fongiques par exemple (Schlitzer *et al.*, 2013).

2.4.4.4. Fonction des pDCs dans l'immunité antivirale et l'auto-immunité

Lorsqu'elles rencontrent des cellules infectées par des virus, les pDCs produisent de l'IFN de type I empêchant la réplication virale et permettant d'activer des cellules effectrices. C'est ainsi qu'elles médient l'immunité antivirale (**Figure 15**). Elles sont essentielles pour contrôler l'infection à un stade précoce, mais également à un stade avancé, où le système immunitaire adaptatif joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection (Swiecki and Colonna, 2016).

Par ailleurs, les pDCs induisent également l'apoptose de cellules tumorales chez l'Homme et la souris *in vitro*, dépendamment du *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) porté à leur surface (Drobits *et al.*, 2012; Kalb *et al.*, 2012).

Ces cellules sont notamment étudiées dans un contexte d'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) chez l'Homme, où elles sont impliquées, avec les MoDCs, dans le trafic du VIH vers les ganglions lymphatiques (Reeves *et al.*, 2012). Cependant, il est intéressant de noter que la présence du VIH dans l'organisme induit, certes, la production persistante d'IFN, mais surtout, provoque l'apoptose des LT $CD4^+$ infectés, *via* TRAIL exprimé sur les pDCs (Stary *et al.*, 2009). L'induction de la mort des LT $CD4^+$ participe en partie à l'évolution de l'infection par le VIH, ainsi qu'à l'apparition des symptômes évocateurs du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ici, c'est donc un rôle plutôt délétère des pDCs qui est mis en avant. Il a également été observé que le VIH active les pDCs, qui ensuite vont stimuler la différenciation de LT $CD4^+$ en LT régulateurs (LTregs) possédant une fonction suppressive, par un mécanisme dépendant de l'*indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase* (IDO) (Manches *et al.*, 2008). Suite à la liaison du VIH aux LT $CD4^+$ et à l'activation cellulaire provoquée par la détection de l'ARN viral par TLR-7, la voie TLR/MyD88 est enclenchée, ce qui provoque l'expression d'IDO par les pDCs. Sur le plan fonctionnel, les Tregs générés par les pDCs inhibent la maturation des cDCs (Manches *et al.*, 2008). Ainsi, les pDCs sont impliquées, soit, positivement dans le décours de cette pathologie, soit, négativement.

La communication évoquée entre les pDCs et les LTregs médiée par l'IDO, a également été démontrée essentielle pour réguler l'inflammation dans un autre contexte, celui des maladies auto-immunes, comme l'EAE (Lippens *et al.*, 2016). Au cours du développement de l'EAE, l'expression d'IDO par les pDCs apparait comme nécessaire pour la génération de LTregs capables d'atténuer l'amorçage des LT encéphalitogènes et la gravité de la maladie. Ici, les pDCs auraient un rôle bénéfique puisque limitantes de la progression de la maladie auto-immune. Néanmoins, leurs effets délétères ont été remarqués dans deux autres pathologies à terrain auto-immun. Premièrement, dans le lupus érythémateux disséminé, où il a été démontré que les pDCs circulantes étaient fonctionnellement anormales. Celles-ci n'expriment pas le TLR-9, ce qui serait en partie responsable du défaut de différenciation des LTregs. De plus, a été retrouvée une expression persistante de transcrits d'IL-10, entretenant l'inflammation latente (Jin *et al.*, 2010).

Deuxièmement, dans un modèle murin de diabète de type I, il a été démontré que la déplétion constitutive des pDCs (E2.2$^{-/-}$) réduisait l'incidence de la maladie (Hansen *et al.*, 2015).

C'est alors un rôle un peu nuancé et encore peu compris qu'exercent les pDCs dans ces différents contextes pathologiques. Elles induisent la mort de cellules infectées ou tumorales mais aussi celle de cellules saines nécessaires à la lutte contre les pathogènes.

2.4.4.5. Fonction des MoDCs dans l'immunité antimicrobienne

Le sous-ensemble MoDCs est également connu sous le nom de DCs productrices de TNF-iNOS, abrégé en TIP-DCs (Serbina *et al.*, 2003). Une étude menée sur l'infection par *Listeria monocytogenes* a démontré le recrutement de ce sous-ensemble de DCs, alors capable de produire du NO, ainsi que du TNF (Serbina, Shi and Pamer, 2012) (**Figure 15**). C'est grâce à cette capacité que les MoDCs jouent un rôle critique dans l'immunité antimicrobienne, dont l'activation est dépendante de MyD88 médiée par les TLR-4 ou -9 (Copin *et al.*, 2007).

Chez l'humain, les MoDCs ont été retrouvées impliquées dans diverses situations pathologiques, telles que la dermatite atopique, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde ou encore l'ascite tumorale (Hespel and Moser, 2012; Segura and Amigorena, 2013). Les MoDCs isolées de patients atteints d'arthrite ou d'ascite tumorale ont induit des réponses Th17 *in vitro,* promouvant ainsi la défense de l'hôte (Segura *et al.*, 2013).

2.4.5. Concept de DCs immunogènes *versus* tolérogènes

Les DCs peuvent être classées en deux grandes catégories : les pDCs et les cDCs. Les pDCs sécrètent de l'IFN-α et aident à contrôler l'infection virale (Reizis, 2019). Comme pour le sous-ensemble de MoDCs, les pDCs sont entièrement différenciées dans la moelle osseuse, avec une demi-vie de 8 à 9 jours en périphérie (Chen *et al.*, 2007). Les cDCs sont plutôt phagocytaires et possèdent une demi-vie plus courte (environ 2 jours) (Breton *et al.*, 2015). Les cDCs peuvent être subdivisées en DCs résidentes des OLS et DCs migratoires (Segura and Amigorena, 2013). Les DCs résidentes des OLS sont phénotypiquement immatures car elles manquent de ligands pour induire une puissante co-stimulation et peuvent induire l'anergie des cellules T (Horwitz *et al.*, 2019) (**Figure 16**). Tandis que les DCs migratoires présentent un phénotype mature (expression élevée de molécules du MHCII ainsi que de molécules co-stimulatrices) suite à leur recrutement par des stimuli inflammatoires et portent des antigènes à leur surface. Elles peuvent ainsi

présenter des peptides antigéniques, *via* le MHCII, aux lymphocytes T CD4$^+$ et réaliser la *cross*-présentation d'antigènes *via* le MHCI, aux lymphocytes T CD8$^+$. Ces DCs migratoires peuvent devenir des DCs tolérogènes matures, induisant une tolérance immunitaire, plus efficacement que les DCs résidentes chez la souris (Idoyaga *et al.*, 2013).

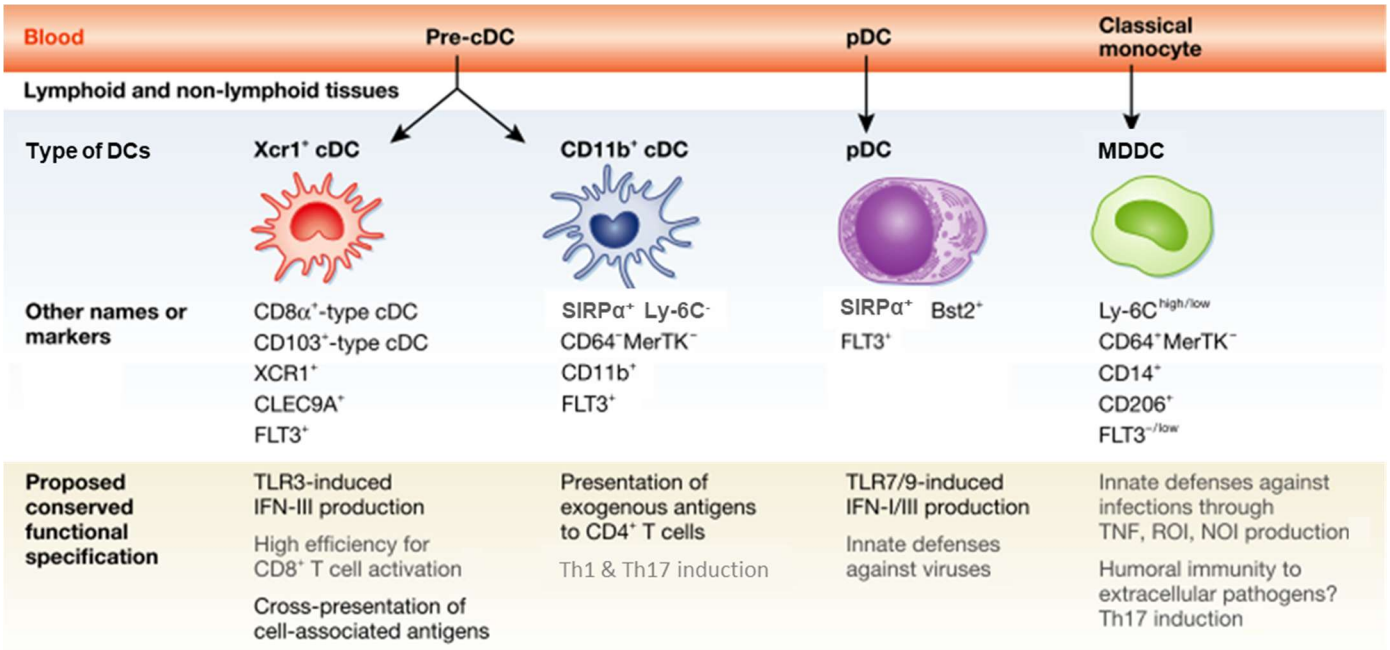


Figure 15 : Vue globale des principaux sous-ensembles de DCs.
Les divers sous-types de DCs sont représentés indépendamment de leur localisation dans les OLS ou dans le parenchyme des organes lymphoïdes. Ils correspondent, dans l'ordre, aux cDC1, cDC2, pDCs et MoDCs. Les précurseurs qui se trouvent dans les organes lymphoïdes secondaires ou dans la circulation sanguine donnent naissance aux quatre principaux sous-ensembles de DCs représentés. Les marqueurs ou noms utilisés pour identifier ces sous-ensembles, ainsi que la spécialisation fonctionnelle de chacun d'entre eux est également indiquée (figure adaptée de Dalod et al., 2014).

Les cellules dendritiques sont au centre des réponses immunitaires et sont définies par leur capacité à sonder leur environnement, à capturer et à traiter des antigènes, ainsi qu'à migrer vers les OLS où elles les présentent aux lymphocytes. Ainsi, les DCs forment une interface essentielle entre la détection de pathogènes *via* les processus médiés par l'immunité innée et l'activation de l'immunité adaptative. L'activation du système immunitaire inné est ainsi un prérequis élémentaire à l'activation et l'initiation de la plupart des fonctions effectrices des cellules du système immunitaire adaptatif.

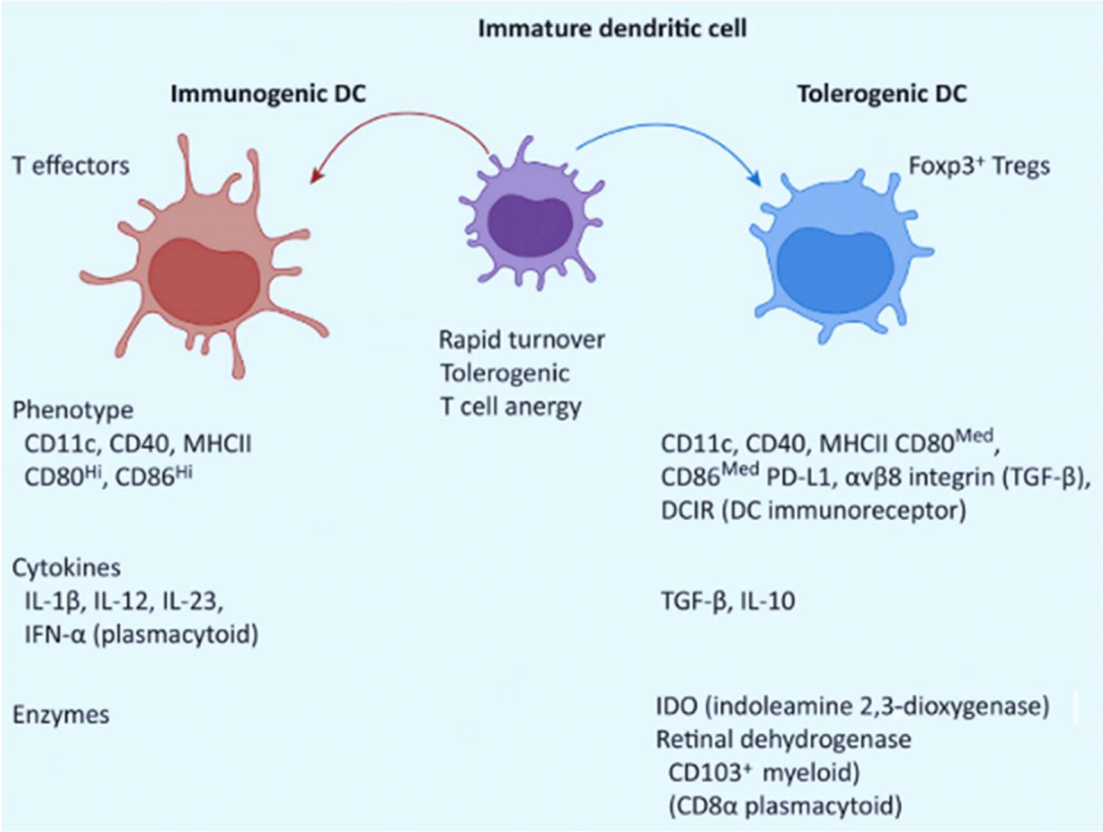


Figure 16 : Illustration du concept de DCs immunogènes versus tolérogènes.
Chaque sous-ensemble de DCs décrit peut soit être regroupé sous le terme de DCs immunogènes lorsque les DCs sont migratoires, soit sous le terme de DCs tolérogènes lorsque les DCs se trouvent résidentes de tissus, tels que les OLS. C'est en réponse aux signaux environnementaux, cytokines et chimiokines que les DCs tendent à faire partie de l'un ou de l'autre groupe de DCs (Horwitz et al., 2019).

2.5. La distinction des macrophages et DCs, un défi de taille

In vivo, la plupart des cellules sont identifiées sur la base de leur ontogénie, de leur phénotype et de leur fonction. En revanche, la définition des DCs et des macrophages tissulaires reste principalement phénotypique. L'utilisation des marqueurs de surface cellulaire, tels que F4/80, CD11b et CD11c comme « substituts » de l'origine et de la fonction, conduit à une confusion sur la contribution exacte des macrophages et des DCs dans l'immunité. En effet, les intégrines CD11b et CD11c peuvent être exprimées à plus ou moins hauts niveaux sur les deux types cellulaires. Le rôle des cellules CD11c$^+$ ne reflète donc pas toujours le rôle des DCs *in vivo*, bien qu'il en soit un marqueur caractéristique ; de même que le CD11b ne reflète pas toujours le rôle des macrophages, bien qu'il en soit également un marqueur caractéristique. Cela s'applique également au marqueur F4/80, car celui-ci est également exprimé par les polynucléaires éosinophiles dans l'intestin, ou même, par les neutrophiles dans la moelle osseuse. Ces marqueurs

ne sont pas spécifiques, mais plutôt caractéristiques des types cellulaires qui les portent et qui ont été décrits dans l'introduction.

La différenciation des macrophages des cellules CD11c$^+$ MHCII$^+$, indépendamment des cDC1 (BATF3$^+$IRF8$^+$ID2$^+$), demeure difficile et ce, probablement parce que ces cellules sont très hétérogènes. Il est néanmoins possible d'essayer de différencier les macrophages des DCs en se basant sur (Hashimoto, Miller and Merad, 2011) :

- Leur origine : les DCs proviennent de progéniteurs de cellules dendritiques et leur différenciation est dépendante de Flt3L. Ce qui n'est pas le cas des macrophages,
- Leur phénotype : les macrophages expriment tous, ou partie, des marqueurs CD11b, F4/80, CX3CR1 et SIRPα. Ce sont des marqueurs caractéristiques qui ne sont retrouvés qu'en minorité sur les DCs. Les cDC2 expriment le CD11b, mais pas les cDC1,
- Leur fonction : les cDC1 ont une puissante capacité à initier la différenciation des LT par rapport aux macrophages et en même temps, ont un potentiel de phagocytose beaucoup plus faible qu'eux. En général, les DCs sont d'excellentes APCs, mais de piètres phagocytes en comparaison aux macrophages, et inversement. Enfin,
- Leur potentiel migratoire : les DCs migrent plus dans les OLS que les macrophages.

En somme, la confusion sur l'identification des DCs et des macrophages, ainsi que sur leur contribution dans l'immunité, est en partie due au fait que les marqueurs « génériques » CD11b, CD11c, MHCII, ne sont pas synonymes de macrophages ou de DCs. Il est alors nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs afin de discriminer, en pratique et surtout dans des expérimentations menées *in vivo*, ces différents types et sous-types cellulaires. Le terme MPS, depuis longtemps employé, était un socle à la compréhension de la répartition et constituait une première clef d'identification des cellules du système immunitaire inné. Cependant, celui-ci doit être retravaillé et enrichi avec les connaissances actuelles, prenant en compte la diversité et l'hétérogénéité de ces cellules dans l'ensemble de l'organisme. Guilliams et collaborateurs ont proposé, il y a quelques années, une nomenclature en deux étapes, basée sur la définition du MPS introduite il y a cinquante-quatre ans (van Furth and Cohn, 1968; Guilliams *et al.*, 2014) (**Figure 17**).

En parallèle des réponses cellulaires décrites, d'autres systèmes de défense vis-à-vis des infections se mettent en place mécaniquement via l'intervention de protéines, enzymes et protéases : la

formation de thrombus, pour faire barrage à la propagation des microorganismes : c'est l'enclenchement de l'hémostase, la mise en place du système de coagulation.

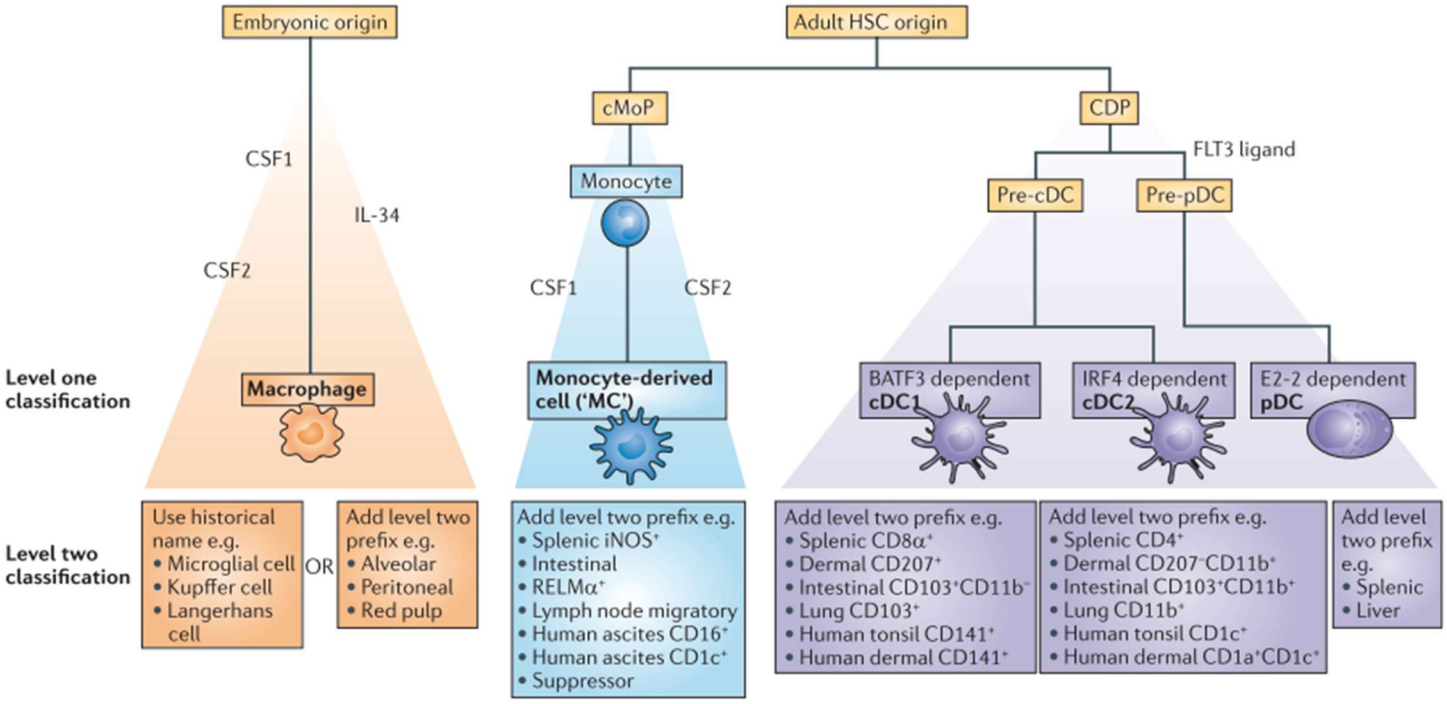


Figure 17 : Nomenclature revisitée du MPS.

Le niveau 1 de cette nomenclature propose de définir les phagocytes mononucléaires d'abord sur la base de leur ontogénie, suivie de leurs fonctions, leur localisation et/ou leur morphologie. Cela donne trois principaux groupes de cellules, à savoir, les DCs dérivées de précurseurs communs aux DCS, les macrophages issus de l'embryogenèse et les cellules dérivées de monocytes. Il est suggéré que les DCs soient subdivisées en cDC1, cDC2 et pDCs, car leur développement dépend de facteurs de transcription distincts, mais aussi, car elles proviennent de précurseurs différents. Ce niveau 1 de la nomenclature comprend également d'autres noms employés et largement acceptés. Le niveau 2 de cette nomenclature peut inclure des marqueurs de surface permettant d'identifier les cellules, la spécialisation fonctionnelle étudiée, ou des informations sur la localisation cellulaire. Des exemples sont fournis. Cependant, dans de nombreux cas, le niveau 1 devrait être suffisant pour définir adéquatement une population, sauf lorsqu'une nouvelle fonction et/ou un marqueur pertinent est nécessaire pour discerner un sous-ensemble cellulaire particulier. cMoP, common monocyte progenitor; CSF1, colony-stimulating factor 1 (also known as M-CSF); CSF2, colony-stimulating factor 2 (also known as GM-CSF); RELMα, resistin-like molecule-α (Guilliams et al., 2014).

II. L'hémostase, activée au cours de l'inflammation

1. L'hémostase, généralités

L'hémostase est un ensemble de phénomènes physiologiques, à la fois physiques et biochimiques, qui s'initient lorsqu'un vaisseau sanguin est endommagé. Elle a pour finalité de maintenir l'intégrité des vaisseaux. En effet, l'hémostase définie comme l'arrêt du saignement, vient du grecque « *haeme* » signifiant « sang » et « *stase* » signifiant « arrêter ». Cet équilibre thrombo-hémorragique est maintenu dans le corps par de multiples interactions entre la coagulation du sang, le système fibrinolytique ainsi que les plaquettes et la paroi vasculaire (Palta, Saroa and Palta, 2014).

Lorsqu'une lésion vasculaire survient, un saignement ainsi qu'une zone lésée apparaissent. Conséquemment, l'hémostase se met en place, ce qui se traduit par la création d'un caillot sanguin visant à arrêter l'épanchement. Ainsi, elle contribue à maintenir un flux sanguin régulier dans le système circulatoire et donc, à restaurer un équilibre homéostatique. L'hémostase se produit en deux étapes principales : l'hémostase primaire et secondaire, complétée par l'étape de fibrinolyse (Potzeha, 2021) (**Figure 18**) :

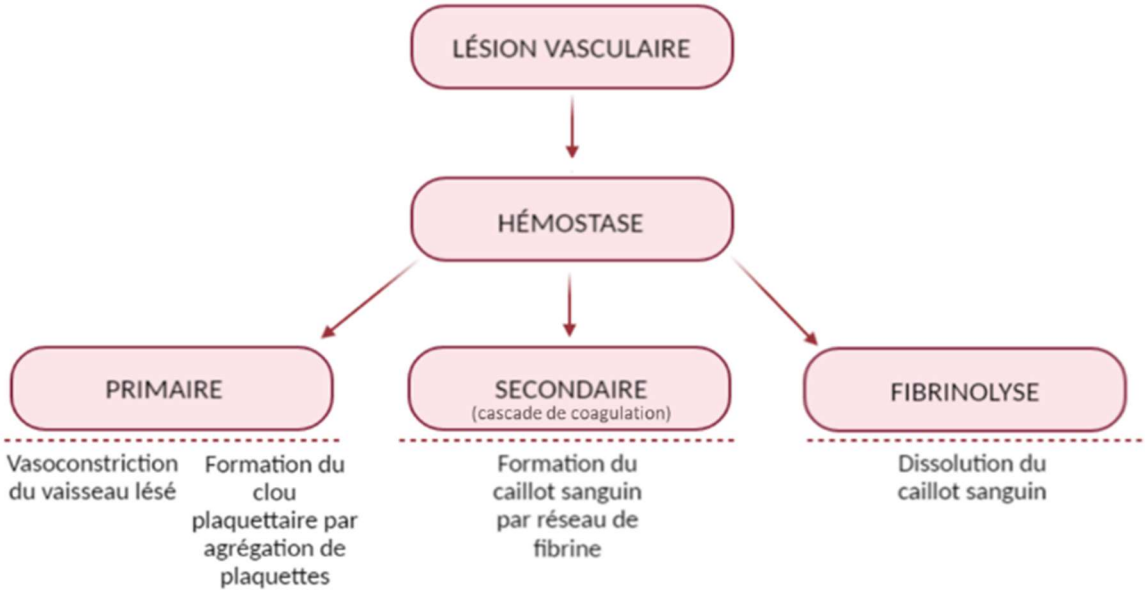


Figure 18 : Représentation schématique de l'hémostase lors d'une lésion vasculaire, avec ses trois étapes interdépendantes. *L'hémostase primaire se déclenche instantanément après la survenue d'une lésion ou d'une infection d'un tissu. Cette étape est caractérisée par l'activation et l'agrégation des plaquettes. L'hémostase secondaire est caractérisée par l'activation de la cascade de coagulation entraînant des dépôts de fibrine au site lésé. La fibrinolyse consiste en la dissolution des caillots de fibrine (thèse de Fanny Potzeha., 2021).*

1.1. La première étape : l'hémostase primaire

L'hémostase primaire se déroule en deux phases. La première concerne la vasoconstriction au niveau de la lésion. Les muscles lisses présents au niveau vasculaire se contractent afin de réduire ou stopper le flux sanguin. La seconde phase fait référence à l'activation et l'agrégation des plaquettes entraînant la formation d'un clou plaquettaire au site lésé, autrement appelé bouchon hémostatique primaire. Lorsqu'une lésion traumatique est présente, certains composants vasculaires du sous-endothélium, alors exposé, sont accessibles. Le facteur von Willebrand (vWF), le collagène ainsi que des protéines pro-coagulantes sont alors libérés dans l'environnement endommagé. L'ensemble de ces composés permet aux plaquettes d'être recrutées puis activées au site de lésion. D'abord, elles sont activées grâce au collagène, l'adrénaline, l'adénosine diphosphate (ADP) et la thrombine (Broos *et al.*, 2011). Une fois activées, les plaquettes modifient leur conformation pour adhérer à l'endothélium, auquel elles se lient *via* le vWF. Elles sécrètent ensuite des médiateurs, tels que le thromboxane A2 qui a un rôle chémo-attractant envers les plaquettes, favorisant leur recrutement en masse et leur agrégation pour former le bouchon hémostatique primaire temporaire (Palta, Saroa and Palta, 2014).

La majorité des molécules mises en jeu dans l'hémostase primaire sont des composants hautement thrombogéniques qui activent en parallèle la cascade de coagulation (Broos *et al.*, 2011; Palta, Saroa and Palta, 2014).

1.2. La seconde étape : l'hémostase secondaire ou l'activation de la cascade de coagulation

Le clou hémostatique crée au cours de l'hémostase primaire vient être renforcé, durant la phase d'hémostase secondaire, par l'activation d'une myriade de protéines, majoritairement des sérine-protéases, essentielles à la formation d'un caillot sanguin stable.

La coagulation est l'étape de l'hémostase qui permet de consolider l'arrêt du saignement ou la propagation de l'infection. Le terme « coagulation » désigne la densification de matières liquides, à l'image du sang qui, à l'aide de multiples facteurs moléculaires, se densifie en un caillot sanguin.

Le concept de coagulation sanguine remonte aux années 1960 lorsque Earl Davie, Oscar D. Ratnoff et Robert G. Macfarlane ont décrit la « cascade » et théories en « cascade » décrivant le

principe fondamental de l'activation en cascade de pro-enzymes en enzymes (Davie and Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964).

La cascade de coagulation est divisée en deux voies qui convergent et provoquent, *in fine*, l'activation de la thrombine avec le clivage ultérieur du fibrinogène soluble en fibrine insoluble, qui forme l'armature du caillot.

1.2.1. La voie intrinsèque de la coagulation, aussi nommée voie d'activation par contact

L'activation de la voie intrinsèque de la coagulation est le plus souvent associée à un traumatisme tissulaire direct (Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004). Celle-ci est également appelée voie d'activation par contact car son acteur principal, le facteur de coagulation XII (facteur de Hageman), une protéine synthétisée dans le foie, est activée en se liant à la membrane basale de l'endothélium exposé, au collagène, aux plaquettes activées, au kininogène de haut poids moléculaire, à la pré-kallikréine ainsi qu'au facteur XI (Palta, Saroa and Palta, 2014; Long *et al.*, 2016). Cette voie est alors principalement responsable de l'activation de ce facteur XI *via* le facteur XII activé (XIIa). L'ensemble de ces phénomènes mènent à l'activation de la voie commune de la coagulation, partagée par les voies intrinsèque et extrinsèque (**Figure 19**).

1.2.2. La voie extrinsèque de la coagulation, aussi nommée voie du facteur tissulaire

La voie extrinsèque est initiée par la production de facteur tissulaire (FT) présent dans les tissus extravasculaires proches des vaisseaux endommagés. Le FT est exprimé sur des surfaces tissulaires qui ne sont normalement pas exposées au compartiment vasculaire, tels que les tissus sous-cutanés et la couche adventice des vaisseaux sanguins (Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004). La présence du FT provoque l'activation du facteur VII, ce qui mène ces deux facteurs à se complexer et enclencher la voie commune de la coagulation (**Figure 19**).

1.2.3. Convergence des deux voies de la coagulation : la voie commune

Le complexe FT-facteur VIIa, provenant de la voie extrinsèque, active les facteurs IX et X (Kirchhofer and Nemerson, 1996). Il s'avère que *via* la voie intrinsèque de la coagulation, le facteur XIa vient accentuer l'activation du facteur IX. De la même façon, *via* la voie intrinsèque le facteur X est activé par le facteur IXa, associé à son cofacteur VIIIa. Ces derniers forment un complexe

appelé complexe ténasique, qui, en présence de calcium est retrouvé à la surface des phospholipides provenant des cellules endothéliales lésées et des plaquettes activées (Palta, Saroa and Palta, 2014).

L'activation de cette série de facteurs de coagulation engendre l'activation de la prothrombine (facteur II) *via* l'association du facteur Xa et de son cofacteur Va, constituant le complexe prothrombinase. Ce complexe enzymatique libère ainsi de la thrombine, capable d'amplifier la cascade de coagulation, et, par conséquent, sa propre formation. De surcroît, cette enzyme est apte à activer les plaquettes et donc à réguler l'étape d'hémostase primaire. Elle est ainsi une enzyme clef de la cascade de coagulation (Dahlbäck, 2000; Lane, Philippou and Huntington, 2005) (**Figure 19**).

De plus, la thrombine régule la conversion du fibrinogène en fibrine et active le facteur XIII responsable de la réticulation des filets de fibrine, consolidant le maillage du bouchon hémostatique primaire, devenant un bouchon hémostatique secondaire définitif (Falati *et al.*, 2002; Posma, Posthuma and Spronk, 2016).

La voie extrinsèque est primordiale pour un fonctionnement efficace de l'hémostase. Il s'agit de la voie qui s'initie le plus rapidement lorsqu'un évènement vasculaire traumatique survient. Tandis que la voie intrinsèque est plus lente et n'est pas vitale. En effet, des patients atteints d'une déficience congénitale pour le facteur XII possèdent des capacités hémostatiques physiologiques et ne présentent pas de saignement exacerbé (Renné *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2016). De plus, il a été observé que lorsque celle-ci est inhibée, le risque de thrombose chez les patients à haut risque de maladies cardiovasculaires diminuait (Wheeler and Gailani, 2016). En effet, le facteur XII est impliqué dans la formation de thromboses, mais également décrit pour son implication dans la propagation des infections, ainsi que pour son rôle dans la régulation de certaines cellules immunitaires (Renné *et al.*, 2005; Matafonov *et al.*, 2014; Renné and Stavrou, 2019). Celui-ci favorise, entre autres, la différenciation des lymphocytes Th17 et la fonctionnalité des neutrophiles (Göbel *et al.*, 2016; Maas and Renne, 2018; Renné and Stavrou, 2019). La description de l'ensemble de ces processus appuie le fait que les voies intrinsèque et extrinsèque de l'hémostase secondaire sont indépendantes l'une de l'autre mais très complémentaires.

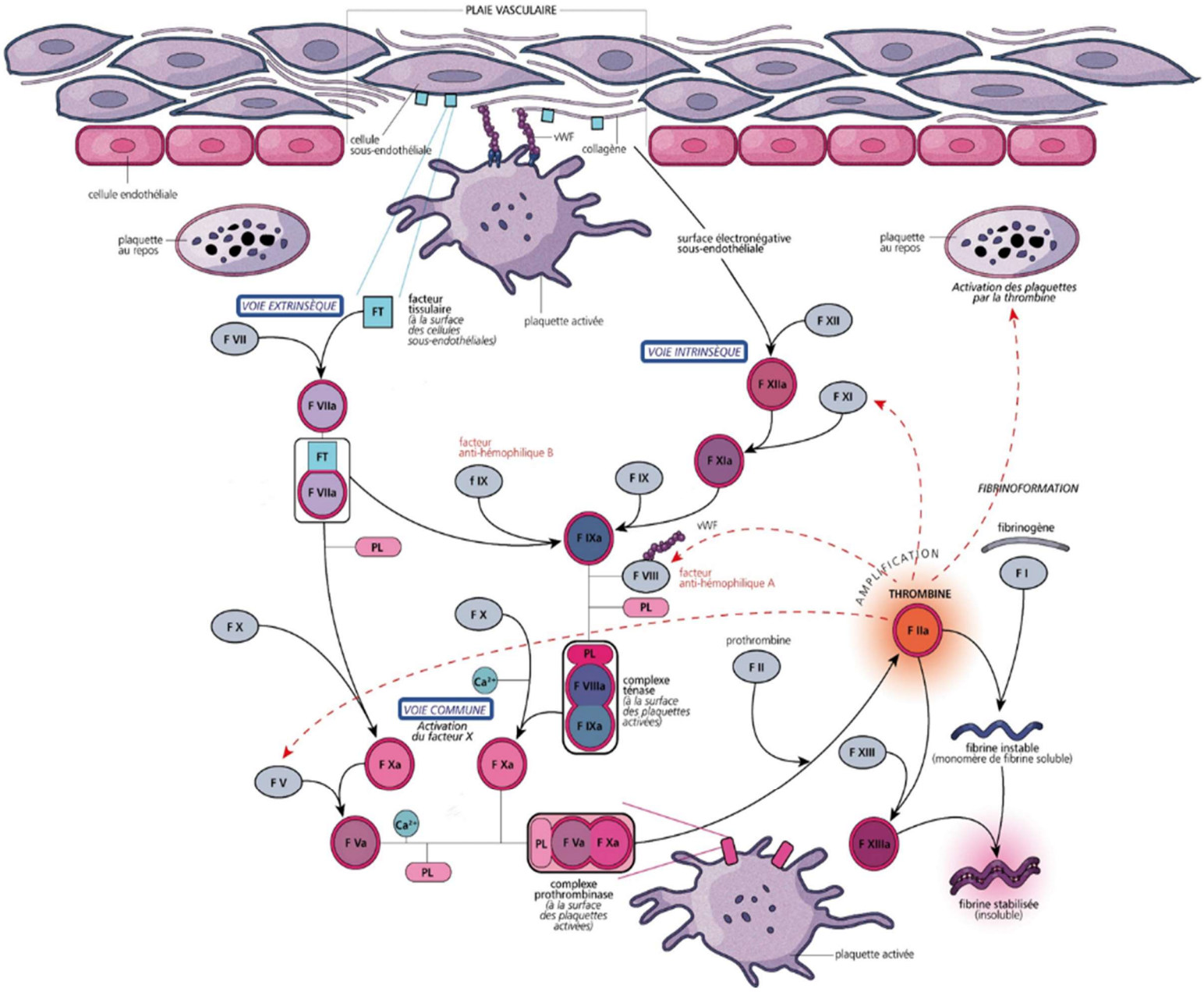


Figure 19 : Activation de l'hémostase secondaire ou cascade de coagulation.
Après une lésion vasculaire, le sous-endothélium expose le collagène et le FT à la circulation sanguine. L'exposition de ces composants déclenche simultanément l'initiation de la voie extrinsèque et de la voie intrinsèque de la coagulation. PL : phospholipides. (MHEMO, filière des maladies hémorragiques constitutionnelles : https://mhemo.fr/wp-content/uploads/2019/10/coagulation-plasmatique-corr.jpg).

Enfin, lorsque le saignement s'endigue grâce à l'initiation des étapes d'hémostases primaire et secondaire, le caillot sanguin majoritairement constitué de fibrine, n'est plus utile. C'est alors que, grâce à l'implication de nouvelles enzymes, celui-ci va être dissout suivant la phase complémentaire de l'hémostase, à savoir, la fibrinolyse.

1.3. L'étape complémentaire de l'hémostase : la fibrinolyse

Le système fibrinolytique s'active en parallèle de la phase d'hémostase secondaire, au cours de laquelle il limite la taille du caillot. *In fine*, le système fibrinolytique le résorbe entièrement.

La dissolution du thrombus s'opère par l'action de la plasmine, résultant en la création de produits de dégradation de la fibrine. La plasmine est une protéase d'origine hépatique, d'abord produite sous sa forme inactive : le plasminogène (Chapin and Hajjar, 2015). Ce zymogène est notamment retrouvé au sein même des caillots sanguins, possédant une forte affinité pour la fibrine (Kim *et al.*, 2012). Ainsi, l'activation du plasminogène en plasmine se fait au niveau du caillot et cette réaction est catalysée par l'une des deux sérine-protéases suivantes :

- L'urokinase (uPA), dont le précurseur inactif est la pro-urokinase activée *via* la kallikréine et la plasmine,
- L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA).

L'urokinase est produite par les monocytes, les macrophages ainsi que les cellules épithéliales du système urinaire. Cette enzyme a une affinité faible pour le plasminogène, ne nécessite pas de fibrine comme cofacteur et dans des conditions physiologiques, agit principalement dans des localisations extravasculaires. Le tPA, quant à lui, est, entre autres, synthétisé et libéré par les cellules endothéliales intactes bordant la zone lésée et a une forte affinité pour le plasminogène. Cependant, il nécessite la présence de la fibrine, son principal activateur (Chapin and Hajjar, 2015). La biologie du tPA est décrite à partir de la page soixante-douze de l'introduction.

La plasmine possède une activité protéolytique à large spectre, puisqu'elle est capable de dégrader, non seulement, la fibrine, mais aussi le fibrinogène, ainsi que les facteurs de coagulation V et VIII. Au vu des multiples actions de la plasmine, son activité est étroitement régulée par son inhibiteur majeur direct, l'α2-antiplasmine, ainsi que l'α2-macroglobuline, qui empêchent ainsi une fibrinolyse généralisée (Al-Horani, 2015). La production de plasmine est inhibée de façon indirecte *via* les inhibiteurs d'activateurs du plasminogène (PAI) qui inhibent donc, en amont, les activateurs du plasminogène. En complément, il existe un inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI) dont le but est d'empêcher le plasminogène et le tPA de se fixer aux résidus de fibrine (Cesarman-Maus and Hajjar, 2005).

L'ensemble de ces processus hémostatiques coordonnés visent à restaurer l'homéostasie, qui est perturbée à la suite d'une lésion vasculaire d'origine infectieuse ou traumatique. En parallèle et

de manière interdépendante à l'hémostase, une inflammation est initiée pour protéger l'organisme et participer à la régénération/réparation tissulaire.

Un large éventail de maladies à composante inflammatoire, telles que la septicémie, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques, mais encore la COVID, est associé à une réponse inflammatoire dérégulée, mais également à une perturbation de la coagulation (Adams *et al.*, 2007; Paul, Strickland and Melchor, 2007; Levi, 2010; Bonaventura *et al.*, 2021).

2. La coagulation et l'inflammation sont intimement liées

2.1. L'association de ces deux systèmes au cours de l'évolution

Les invertébrés et les vertébrés partagent plusieurs grands systèmes biologiques de défense de l'hôte. Ceux-ci comprennent la production d'agents antimicrobiens induite par la stimulation des TLRs, la production de ROS, le système du complément, la phagocytose, mais aussi la coagulation (Iwanaga and Lee, 2005). Par exemple, la limule, animal « fossile vivant » représentatif des plus anciennes classes d'arthropodes, possède un système circulatoire ouvert. Elle ne possède pas de système immunitaire adaptatif, mais possède des mécanismes de défenses innés efficaces pour limiter l'invasion d'agents pathogènes et favoriser une guérison rapide. Quatre-vingt-dix-neuf pour cent de ses cellules circulantes sont des hémocytes exprimant des PRRs qui se lient aux agents pathogènes. Cela provoque leur activation et dégranulation, conduisant à la formation d'un caillot qui limite la perte d'hémolymphe et piège simultanément les bactéries, empêchant l'expansion de l'infection dans tout l'organisme. Cette réponse coordonnée est possible grâce au contenu des granules de sécrétion d'un type d'hémocytes, qui comprennent des facteurs de coagulation, des molécules primaires coagulogéniques, des agents antimicrobiens, des lectines qui reconnaissent les glucides présents sur les agents pathogènes et des défensines (Iwanaga, 2002; Iwanaga and Lee, 2005). Les facteurs de coagulation libérés sont des formes zymogènes de sérine-protéases possédant des propriétés opsonisantes, des motifs structuraux similaires à ceux du système du complément humain et des facteurs de coagulation (Zhu *et al.*, 2005). Lors de leur libération, ceux-ci sont activés et déclenchent une cascade qui transforme le coagulogène en coaguline, possédant des activités agglutinantes et bactéricides. Enfin, un analogue du facteur XIIIa chez l'Homme, une transglutaminase qui réticule la coaguline, favorise la cicatrisation.

La plupart des études démontrent que le système de coagulation des vertébrés a évolué de manière concomitante au système immunitaire inné. En effet, les sérine-protéases impliquées dans la coagulation divergent de celles qui composent le système du complément (Krem and Cera, 2002). Les différences sont progressivement apparues, notamment par l'acquisition de structures protéiques uniques, telles que les domaines *Kringle* de certaines sérine-protéases, caractérisés par leur affinité pour la fibrine. Cela répond à la nécessité des organismes vertébrés, devenant de plus en plus complexes, d'acquérir des mécanismes plus spécialisés pour se défendre contre un large panel d'infections et de traumatismes divers (Delvaeye and Conway, 2009).

2.2. Limitation des infections et production de cytokines inflammatoires

Aujourd'hui encore, il demeure des interactions étroites entre la coagulation et l'immunité. Par exemple, le phénomène de coagulation peut, à travers la formation de caillots sanguins, physiquement restreindre la progression des microorganismes dans le sang, comme c'est le cas pour la limule. D'autre part, c'est *via* sa voie extrinsèque que la coagulation participe à la réaction inflammatoire. Elle est décrite comme étant la principale voie de coagulation activée au cours des infections locales ou généralisées (septicémie) (Riewald and Ruf, 2003; Levi, 2010). L'activation de la cascade de coagulation n'est donc pas seulement importante dans la formation de caillots de fibrine qui médie son effet anti-infectieux ; elle a également le rôle de promouvoir l'inflammation. En effet, il a été démontré que le facteur Xa, la thrombine et le complexe FT-facteur VIIa possèdent des caractéristiques pro-inflammatoires. Plus précisément, la thrombine et le complexe FT-VIIa induisent la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF, par les cellules mononucléées et endothéliales (Pawlinski *et al.*, 2003). Cet effet est médié par la liaison de ces facteurs pro-coagulants aux récepteurs activés par les protéases (PARs), présents à la surface de divers types cellulaires comme les leucocytes et les cellules endothéliales (Shrivastava, McVey and Dorling, 2007). Parmi ces récepteurs, ceux qui sont activés par la thrombine sont les PAR-1, -3 et -4 (Riewald and Ruf, 2003).

2.2.1. Le phénomène de vasodilatation induit par la coagulation

Le phénomène de vasodilatation est une des caractéristiques majeures de l'inflammation et est fortement régulé par la thrombine. Lorsque cette enzyme est générée, elle se fixe à son récepteur PAR-1 au niveau des cellules endothéliales. Cela provoque une vasodilatation des

muscles lisses qui sous-tendent l'endothélium et favorise une augmentation de la perméabilité vasculaire (Touyz, 2007). Cette vasodilatation a lieu dans le but de faciliter la délivrance locale de médiateurs solubles et de cellules inflammatoires. Elle est principalement médiée par la production de NO et de prostaglandines, comme la prostacycline (PGI_2). Le NO est produit à partir de la L-arginine, par l'action de l'oxyde nitrique synthase (NOS). Il existe trois isoformes de NOS, dont l'une d'entre elles est la NOS endothéliale (eNOS), synthétisée par les cellules endothéliales activées. Le NO produit provoque le relâchement des cellules musculaires lisses et par conséquent, la vasodilatation du vaisseaux (Claesson-Welsh, 2015) (**Figure 20**). Par ailleurs, les cellules endothéliales contiennent des vésicules de stockage appelées Weibel-Palade *bodies* (WPB), qui sont impliquées dans la sécrétion régulée du vWF mature engagé dans l'agrégation plaquettaire. Leur contenu comprend alors le pro-vWF, la P-sélectine et du tPA (Knipe *et al.*, 2010). La caractéristique de la P-sélectine est de favoriser l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, lorsque la perméabilité vasculaire induite, rend l'endothélium permissif à l'infiltration leucocytaire (Mayadas *et al.*, 1993; Cleator and Vaughan, 2008) (**Figure 20**). De plus, il a récemment été montré que la thrombine avait la possibilité d'activer l'IL-1α pro-inflammatoire directement au site de dommages, entraînant le recrutement de cellules immunitaires (Burzynski *et al.*, 2019).

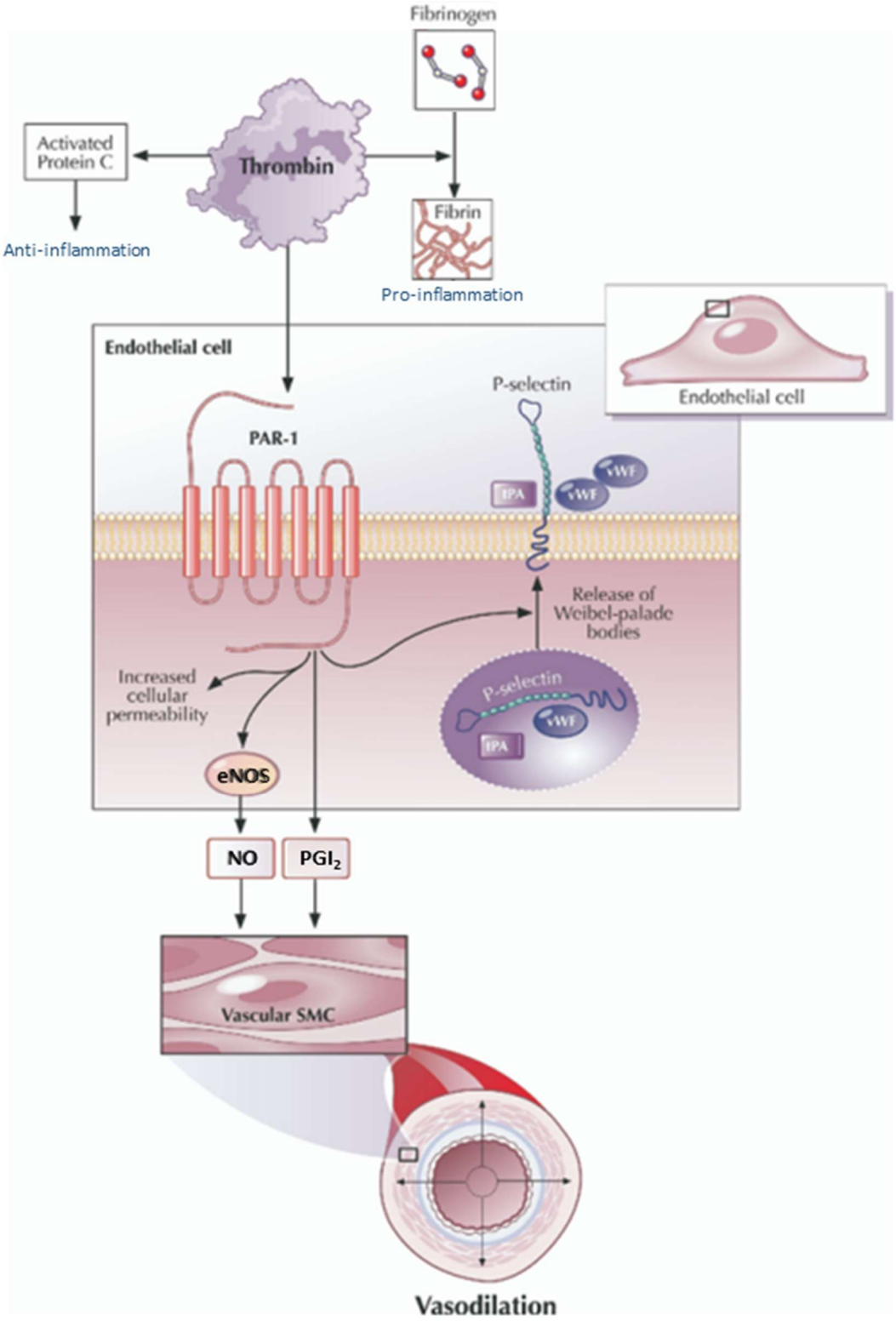


Figure 20 : Illustration des divers rôles de la thrombine impliqués dans la relation coagulation-inflammation. L'activation de la thrombine lui confère des rôles pro-inflammatoires, ainsi que pro-coagulant. La fixation de la thrombine à son récepteur PAR-1 induit la production d'eNOS, puis de NO. Cela provoque la vasodilatation des cellules musculaires lisses (SMC), soutenant le phénomène de perméabilité de l'endothélium. De plus, la thrombine favorise l'étape d'hémostase primaire en agissant sur la libération de vWF, mais aussi sur l'étape de fibrinolyse via la libération de tPA. Enfin, l'expression de la P-sélectine à la surface des cellules endothéliales contribue au « rolling » des leucocytes qui sont sollicités au site intravasculaire lésé. L'activation de la thrombine lui attribue également un rôle anti-inflammatoire médié par les protéines C-réactives (CRP) (figure adaptée de Cleator et al., 2008).

2.2.2. Le phénomène de vasodilatation induit par les cytokines inflammatoires

La vasodilatation des muscles lisses est également retrouvée dans un environnement inflammatoire où l'endothélium est stimulé par du TNF, de l'IL-1, ou de l'IL6, cytokines produites par des leucocytes. Dans ces conditions, la perméabilité vasculaire augmente *via* la présence de NO dans l'environnement, qui est un puissant régulateur du tonus vasculaire (Claesson-Welsh, 2015). En effet, une autre fonction du NO est d'induire une modification post-traductionnelle (la S-nitrosylation) des β-caténines, ce qui entraîne la dissociation des VE-cadhérines, jonctions serrées assurant l'intégrité des endothéliums (Thibeault *et al.*, 2010). Selon la localisation de l'infection, sont retrouvées les deux autres isoformes de NOS, la NOS neuronale (nNOS), produite de manière constitutive, à l'image d'eNOS ; mais aussi l'iNOS, produite par les leucocytes activés après exposition à des agents microbiens ou à des cytokines pro-inflammatoires (Vallance and Chan, 2001; Sherwood and Toliver-Kinsky, 2004; Touyz, 2007) (Figure 21).

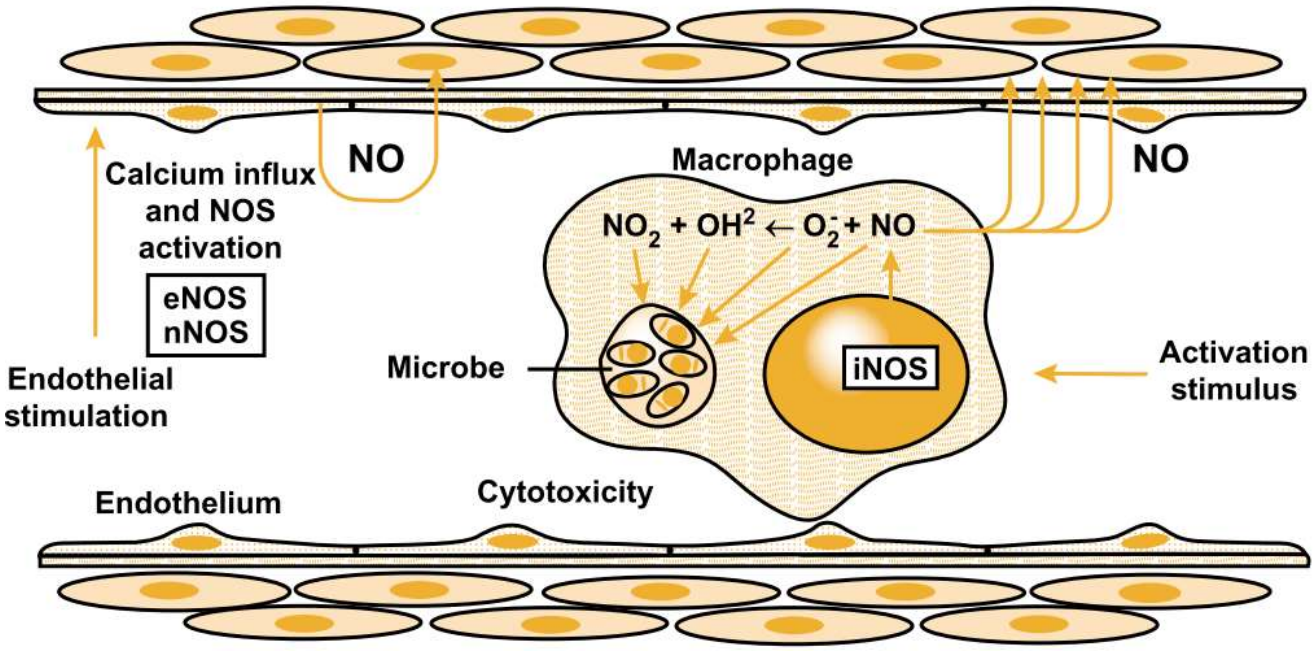


Figure 21 : La stimulation de l'endothélium favorise l'inflammation.
La stimulation de cellules endothéliales entraine la production de NO. Le NO produit engendre la vasodilation du vaisseau et le relâchement des muscles lisses, dans le but de favoriser la transmigration de macrophages pro-inflammatoires par exemple, et de médiateurs biochimiques de l'inflammation. La production de NO est médiée par plusieurs isoformes de NOS, notamment eNOS, nNOS et iNOS. L'expression d'eNOS et de nNOS est régulée par un flux de calcium transcellulaire, tandis que la production d'iNOS est induite par des médiateurs inflammatoires tels que le TNF et l'IL-1 (Sherwood and Toliver-Kinsky., 2004).

2.3. Régulation de l'interaction coagulation-inflammation *via* l'inhibition de la thrombine ou du FT

L'activation de la cascade de coagulation au cours de l'inflammation est limitée par plusieurs facteurs possédant des propriétés anticoagulantes, mais également anti-inflammatoires et protectrices. Les facteurs les mieux définis sont l'anti-thrombine, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) et les protéines C-réactives (CRP).

2.3.1. L'anti-thrombine

De par sa fonction éponyme, l'anti-thrombine produite dans le foie, se lie à la thrombine et l'inactive (Delvaeye and Conway, 2009). La liaison de l'anti-thrombine à la thrombine est fortement potentialisée par l'héparine et les glycosaminoglycanes présents à la surface des cellules endothéliales. Chez les rongeurs, l'interaction de l'anti-thrombine avec la surface des cellules endothéliales favorise la libération de prostaglandines, qui inhibent la production de TNF par les monocytes *via* l'inhibition de NF-κB (Okajima, 2001). Ainsi, l'anti-thrombine peut avoir des propriétés anti-inflammatoires en plus de sa fonction de régulation de la coagulation.

2.3.2. Le TFPI

Le TFPI est présent à la surface des cellules endothéliales ou lié aux lipoprotéines dans le plasma. Il agit en inactivant le FT lié au facteur VIIa, en formant un complexe quaternaire, dont le quatrième composant est le facteur Xa (Broze, 2003). L'inhibition de la fonction du FT entraîne ainsi l'inhibition de la voie extrinsèque de la coagulation au cours de l'inflammation.

2.3.3. Les CRP

Les CRP sont circulantes et activées par le complexe thrombine-thrombomoduline à la surface des cellules endothéliales. Ces protéines ralentissent le processus de coagulation en agissant sur de multiples facteurs (les facteurs Va et VIIIa, IXa, Xa et le complexe FT-facteur VIIa), afin de réduire la génération de thrombine (Esmon, Xu and Lupu, 2011). De plus, à l'image du mécanisme d'action de l'anti-thrombine, les CRP inhibent la production de TNF par les monocytes, initialement induite par la thrombine. Les CRP ont donc un rôle, à la fois anticoagulant et anti-inflammatoire (**Figure 20**). Leur influence dans l'inhibition de ces deux phénomènes a été

démontrée au cours de la septicémie. Les CRP peuvent s'épuiser en raison de leur consommation et de la régulation négative de la thrombomoduline induite par l'inflammation. En résulte alors, la formation incontrôlée de thrombine, provoquant une coagulation accélérée et une activité pro-inflammatoire accrue. L'importance des CRP dans la régulation de la formation de thrombine au cours de la septicémie est démontrée par une mortalité accrue chez les patients en choc septique, qui ont de faibles niveaux de CRP activées (Lim *et al.*, 2003). Aussi, il a été démontré que les CRP possèdent la capacité d'inhiber la réponse pro-inflammatoire médiée par l'IL-6 produite par les macrophages activés (Cao *et al.*, 2010). De façon intéressante, cette activité anti-inflammatoire n'est pas dépendante de leur récepteur endothélial (ECRP), mais de l'intégrine Mac-1 (CD11b/CD18), ainsi que du récepteur PAR-1, tous deux présents à la surface des macrophages. En effet, la délétion génétique du CD11b ou de PAR-1 abroge la capacité anti-inflammatoire des CRP *in vitro*, mais pas la délétion de l'ECRP. *In vivo*, grâce à l'utilisation d'un modèle murin de septicémie induit par le LPS, l'administration de CRP aux animaux réduit la mortalité des souris *wild-type* (WT), mais pas celle des souris déficientes en CD11b (Cao *et al.*, 2010).

De plus, les activités anticoagulantes et anti-inflammatoires des CRP ont été démontrées comme indépendantes dans leur mode d'action. En effet, la suppression d'une région critique pour leur activité anticoagulante, n'a eu aucun effet sur leur fonction anti-inflammatoire (Cao *et al.*, 2010). D'autres études étayent les fonctions des CRP. Il a été montré que les CRP suppriment la production d'IL-1β, d'IL-8 et de TNF pro-inflammatoires par les neutrophiles ainsi que leur migration *in vitro* (Sturn *et al.*, 2003; Stephenson *et al.*, 2006). *A contrario*, les CRP sont capables d'induire la production de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 (Toltl, Beaudin and Liaw, 2008).

2.4. Lien entre coagulation et immunité

Par ailleurs, certains des produits du système de coagulation possèdent des propriétés antimicrobiennes. Par exemple, la β-lysine, un acide aminé produit par les plaquettes durant la phase de coagulation, provoque la lyse de nombreux types de bactéries à Gram-positif en agissant comme un détergent cationique (Gene, 2014). Inversement, les bactéries pathogènes peuvent sécréter des agents qui altèrent le système de coagulation, tels que la streptokinase, un activateur du plasminogène humain, qui favorise alors la fibrinolyse et l'inflammation (Esmon, Xu and Lupu, 2011).

Ainsi, l'inflammation et l'immunité sont étroitement liées à l'activation du système de coagulation et *vice versa*, les facteurs impliqués dans la coagulation modulent de manière marquée la réponse inflammatoire (**Figure 22**) (Del Vecchio *et al.*, 2014). De plus en plus d'éléments indiquent une interdépendance de ces systèmes, de par les rôles essentiels du FT, de la thrombine, des CRP, mais aussi des acteurs fibrinolytiques, dont les caractéristiques sont mentionnées ci-après.

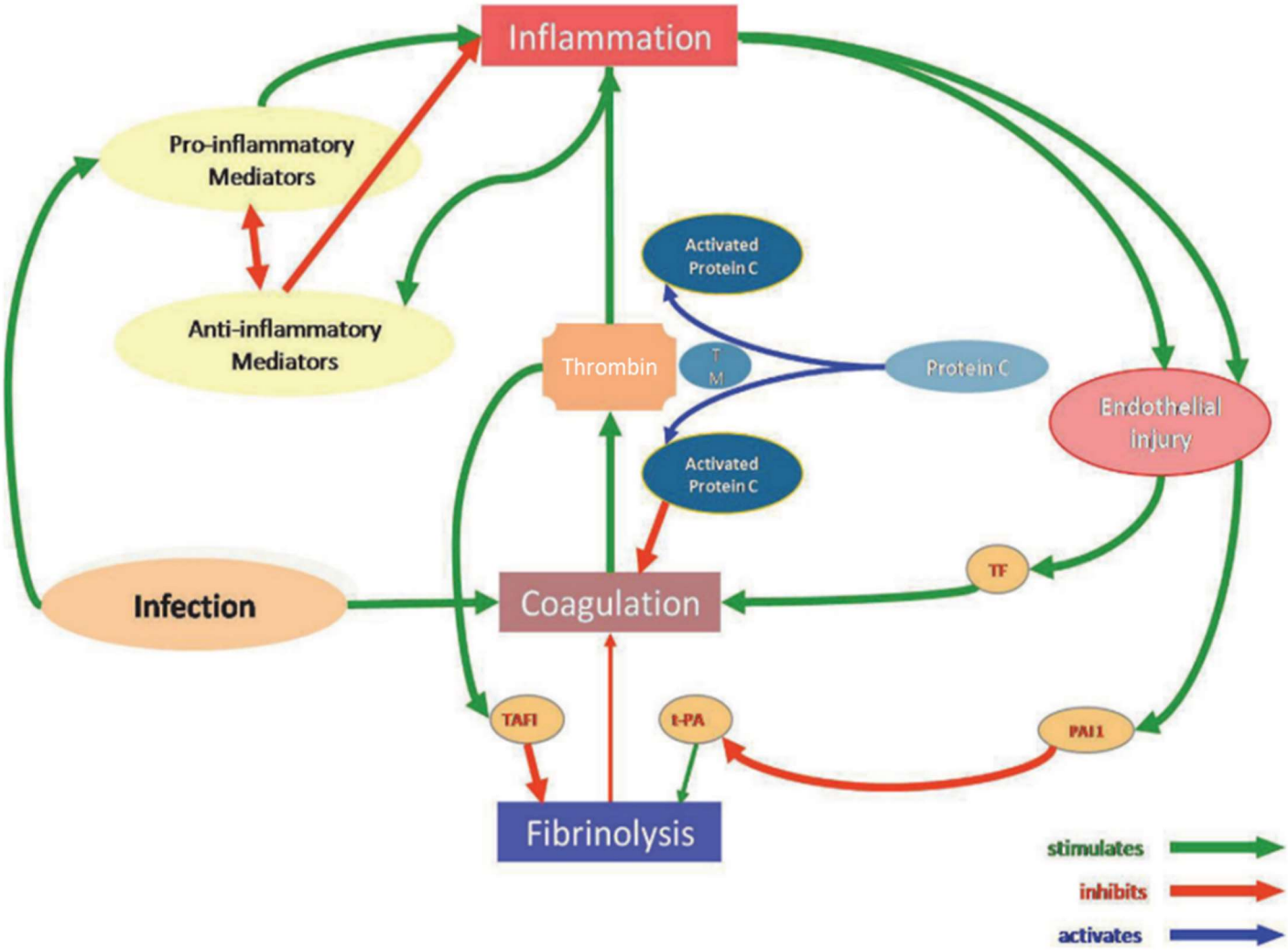


Figure 22 : Représentation schématique de l'interaction entre les systèmes d'hémostase et d'inflammation.
L'invasion de l'hôte par des agents pathogènes provoque la réponse du système immunitaire inné qui active une chaîne d'événements. Ceux-ci se traduisent par la production et la sécrétion de cytokines et chimiokines mais également par l'activation de la coagulation et de la fibrinolyse. La survenue d'une infection grave peut ainsi induire une combinaison de cascades de coagulation, de fibrinolyse et d'inflammation incontrôlées. TM: thrombomodulin (Del Vecchio et al., 2014).

3. Le tPA, l'enzyme clef de la fibrinolyse

3.1. Le tPA et son histoire

En 1903, Sven G. Hedin identifie pour la première fois une activité protéolytique dans une fraction de globulines sériques humaine (Hedin, 1903). C'est près de quarante ans plus tard que la source de cette activité a été identifiée par Tage Astrup et Per Permin. Il s'agit d'une enzyme possédant la capacité d'activer le plasminogène, alors nommée « fibrinokinase » par ces deux chercheurs danois (Astrup and Permin, 1947). La fibrinokinase a été isolée peu après par Astrup et Agnete Stage. (Astrup and Stage, 1952). Puis, c'est en 1979 que celle-ci a été purifiée, non seulement, à partir de vaisseaux sanguins, mais aussi à partir d'utérus de cadavres humains (Binder, Spragg and Austen, 1979; Rijken *et al.*, 1979). Par la suite, c'est grâce à la collaboration de Dingeman C. Rijken avec Désiré Collen que la fibrinokinase est purifiée à partir de surnageants de cellules de mélanomes humains en culture. C'est à partir de ce moment qu'ont débuté les premières études physiologiques et biochimiques de la fibrinokinase, alors générée en quantité suffisante, puis rebaptisée « activateur tissulaire du plasminogène » ou « tPA » (Rijken and Collen, 1981).

C'est grâce à sa capacité à dégrader les caillots sanguins que le tPA a été utilisé pour la première fois chez l'Homme, en 1981, dans le but de traiter des patients atteints de thrombose ilio-fémorale (Weimar *et al.*, 1981). Le clonage du gène du tPA humain a été réalisé deux ans plus tard, marquant alors le début de sa production sous forme recombinante à grande échelle (Pennica *et al.*, 1983). Les scientifiques ne savaient probablement pas à quel point leur travail pionnier allait avoir un impact sur la vie de millions de patients souffrant d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral ischémique. En effet, l'activité fibrinolytique du tPA lui vaut d'être, aujourd'hui encore, le seul traitement pharmacologique de phase aiguë de l'ischémie cérébrale (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995).

3.2. La structure du tPA lui confère diverses fonctions

La biochimie structurale du tPA a été étudiée à la suite de sa découverte ainsi que de sa purification dans les années 1980. C'est une glycoprotéine située sur le chromosome 8 chez l'Homme et codée par le gène *PLAT* (Yang-Feng *et al.*, 1986). Ce gène fait près de trente-trois kb et possède quatorze exons, à l'origine des cinq motifs structuraux qui le composent.

Les cinq domaines du tPA mature sont répartis sur deux chaînes :

- La chaîne lourde comporte les domaines : *Finger*, EGF-*like*, *Kringle*-1 et *Kringle*-2,
- La chaîne légère comporte le domaine sérine-protéase.

Le tPA est d'abord libéré sous sa forme simple chaîne. Sa conversion sous forme double chaîne mature se fait par hydrolyse d'une liaison peptidique entre les acides aminés en position 275 et 276 (Rijken, Hoylaerts and Collen, 1981). Cette hydrolyse est possible grâce à la plasmine ou les kallikréines (Wallén, Bergsdorf and Rånby, 1982; Ichinose, Kisiel and Fujikawa, 1984). Ces deux chaînes ainsi formées restent liées par un pont disulfure et un pont salin, respectivement situés entre les acides aminés en position 299 et 430, 302 et 445 (Lamba *et al.*, 1996).

Chacun de ses domaines lui confère des fonctions diverses (Hébert *et al.*, 2016) (**Figure 23**) :

- Le **domaine *Finger*** est le site de liaison du tPA à la fibrine. Il est nécessaire à la formation d'un complexe ternaire, formé avec le plasminogène (Kagitani *et al.*, 1985). Ce domaine permet également la liaison du tPA au récepteur *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP), ainsi qu'à l'annexine II (aussi appelée annexine A2) (Bu *et al.*, 1992; Hajjar, Jacovina and Chacko, 1994). Enfin, ce domaine est également impliqué dans la liaison du tPA avec l'un de ses inhibiteurs, PAI-1 (Kaneko *et al.*, 1992),
- Le **domaine EGF-*like***, ainsi nommé pour sa forte homologie avec l'EGF, est nécessaire pour l'interaction du tPA avec le récepteur à l'EGF. De plus, la O-glycosylation de ce domaine participe à la recapture, ainsi qu'à la clairance du tPA dans le foie (Hajjar and Reynolds, 1994; Hurtado *et al.*, 2007),
- Le **domaine *Kringle*-1** a été peu étudié. Néanmoins, diverses études supportent l'idée que sa glycosylation facilite sa recapture hépatique *via* les récepteurs au mannose, présents sur les cellules endothéliales du foie (Kuiper *et al.*, 1988),
- Le domaine ***Kringle*-2** possède en son sein un *lysine binding site* (LBS) à forte affinité pour la lysine, important pour que le tPA se lie à divers récepteurs ou substrats, comme le plasminogène, les récepteurs au NMDA ou le PDGF (Fredriksson *et al.*, 2004; Lopez-Atalaya *et al.*, 2008),
- Le **domaine sérine-protéase** du tPA est responsable du clivage du plasminogène en plasmine (Pennica *et al.*, 1983).

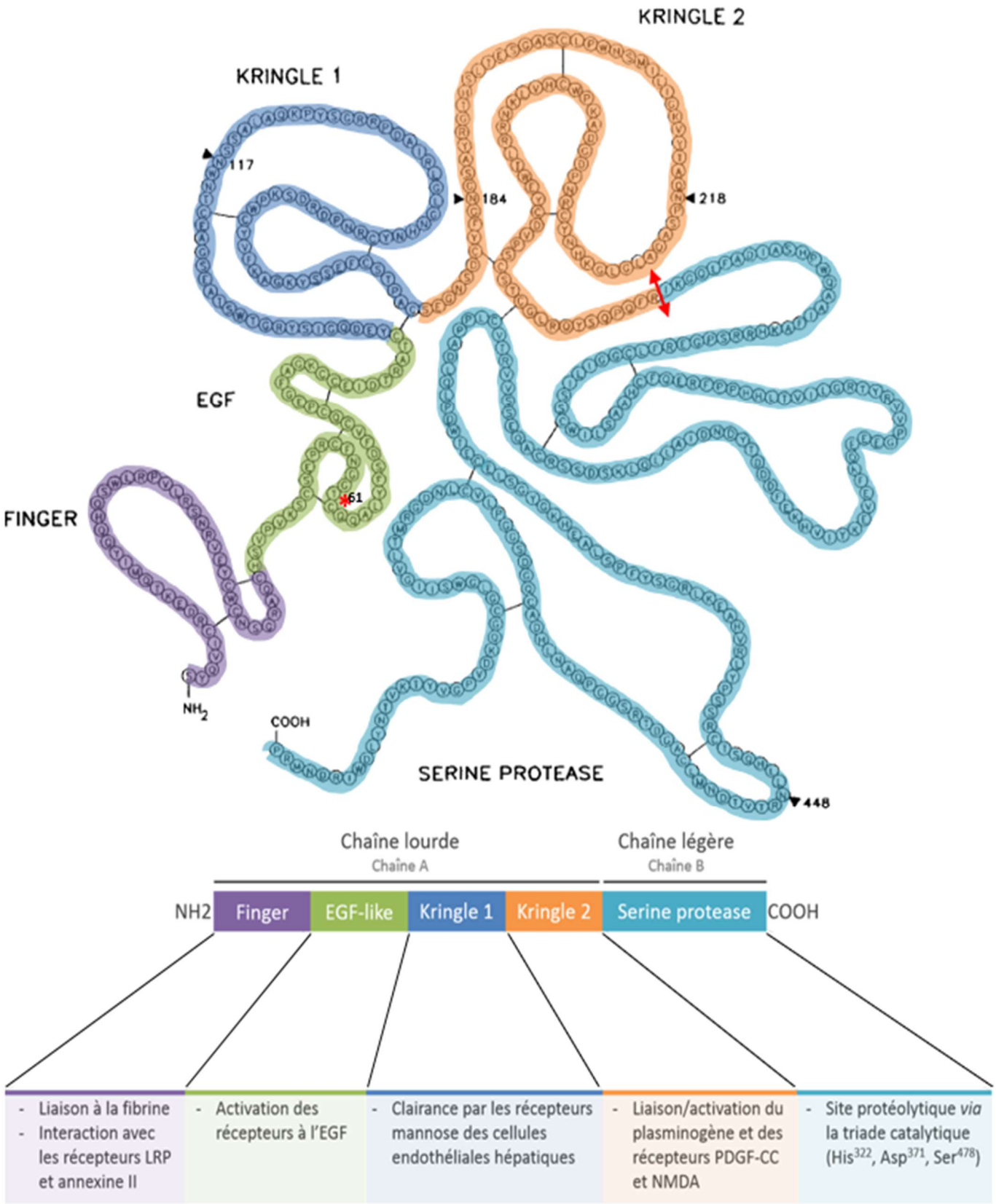


Figure 23 : Structure du tPA lui attribuant diverses fonctions.

Représentation du tPA et de ses cinq domaines (Finger, EGF-like, Kringle-1, Kringle-2, sérine-protéase) sous forme simple chaîne et double chaîne. Les 17 ponts disulfures, les 4 sites de glycosylation ainsi que son site de clivage sont représentés ; respectivement, par des traits noirs entre acides-aminés, flèches noires supplémentées de la position concernée, de la double flèche rouge (figure adaptée de Hébert et al., 2016).

3.3. La synthèse du tPA assurée par différentes sources cellulaires

3.3.1. Le tPA exprimé dans la circulation sanguine

Comme précédemment mentionné, la première source de tPA identifiée était la circulation sanguine. En effet, celui-ci est exprimé, puis sécrété par les cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins (Binder, Spragg and Austen, 1979; Levin, Santell and Osborn, 1997; Rijken and Lijnen, 2009). Avant d'être libéré, il est contenu dans des vésicules denses, les WPB (Huber *et al.*, 2002). Le tPA peut être synthétisé par les cellules endothéliales de deux manières distinctes : soit, de façon constitutive, soit en réponse à des stimuli, tels que des facteurs de la coagulation, un stress mécanique, ou encore l'hypoxie (Levin, Santell and Osborn, 1997; Ito *et al.*, 2000).

Jusqu'à il y a quelques années, les cellules endothéliales étaient suggérées comme étant la source principale de tPA circulant. Pourtant, une étude récente suggère que les hépatocytes produisent également du tPA (Zheng *et al.*, 2019). Cependant, ce sujet demeure controversé. En effet, les cellules endothéliales sont aussi présentes au niveau hépatique et il reste encore difficile d'attribuer de manière certaine une production de tPA par les hépatocytes *in vivo* (Yetim, 2021).

3.3.2. Le tPA exprimé dans le SNC

Dès le début des années 1980, des activateurs du plasminogène ont été identifiés dans le système nerveux central (SNC), plus précisément au niveau de l'endothélium des vaisseaux cérébraux et des neurones, à différents stades du développement chez le rongeur, sans pouvoir affirmer qu'il s'agissait du tPA (Krystosek and Seeds, 1981; Soreq and Miskin, 1981). C'est quelques années plus tard que la synthèse d'ARNm codant pour le celui-ci a été mise en évidence dans les neurones (Sappino *et al.*, 1993). La production de sa forme protéique a ensuite été démontrée au début des années 2000, notamment au niveau des dendrites et synapses neurologiques (Shin, Kundel and Wells, 2004). Depuis, le tPA a été localisé dans de multiples régions cérébrales, ainsi que dans plusieurs types cellulaires, tels que dans les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie (Louessard *et al.*, 2016; Stevenson and Lawrence, 2018).

Le tPA ainsi que la plasmine, ont, *a posteriori*, été impliqués dans de nombreuses activités physiologiques et physiopathologiques dans le cerveau (Yepes and Lawrence, 2007). À titre d'exemple, il a été récemment démontré que le tPA est capable de contrôler le couplage

neurovasculaire en s'activant *via* les récepteurs NMDA présents à la surface des cellules endothéliales cérébrales (Anfray et al., 2020).

Le concept de couplage neurovasculaire repose sur une relation étroite entre les vaisseaux sanguins et les différentes cellules cérébrales, permettant un couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin cérébral (Iadecola, 2017). Ce mécanisme est induit par la libération de facteurs vasoactifs, tels que le NO et/ou la PGI_2, à la suite de l'activation de neurones libérant du tPA. Cela permet d'adapter localement l'apport en substrats énergétiques au niveau des régions cérébrales activées. Les premières données suggérant un rôle du tPA dans l'unité neurovasculaire ont été mises en évidence au début du XXIème siècle. Ainsi, l'injection de tPA au sein d'un ventricule cérébral réduit le tonus vasculaire lors d'une ischémie cérébrale (Cipolla, Lessov and Clark, 2000). Par ailleurs, il a été démontré que le tPA induit une vasodilatation dépendante d'une libération de NO en condition physiologique (Armstead, Cines and Higazi, 2004).

3.3.3. Le tPA exprimé dans de multiples organes

Le tPA est retrouvé exprimé dans bon nombre d'organes, tels que les poumons, le cœur, les reins et les testicules (Rouf, Moo-Young and Chisti, 1996). Il est également présent dans les ovaires, où il est augmenté en période d'ovulation et exprimé dans l'utérus où il participe au déclenchement des menstruations (Lockwood and Schatz, 1996). Ainsi, le tPA est exprimé en conditions physiologiques, mais il peut être également retrouvé en condition pathologique comme c'est le cas dans le cancer du pancréas (Aguilar *et al.*, 2004).

3.4. Action protéolytique du tPA : l'activation de la plasmine

Le rôle majeur du tPA dans la fibrinolyse est de promouvoir la dissolution des caillots sanguins. Néanmoins, le tPA n'est pas fibrinolytique en lui-même. Il favorise la fibrinolyse par conversion du plasminogène lié à la fibrine, en une autre sérine-protéase active, la plasmine. Cela est possible grâce à son domaine protéolytique. La liaison du plasminogène à la fibrine est une étape nécessaire pour changer sa conformation fermée en une forme accessible, permettant son clivage par le tPA (Flemmig and Melzig, 2012). Cette conversion réalisée par clivage d'une unique liaison peptidique au niveau du plasminogène, résulte en une molécule de plasmine à deux chaînes, composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, reliées par un pont de cystéines. La chaîne légère contient le site protéolytiquement actif. La plasmine convertit à son tour de manière

similaire le tPA à chaîne unique en une forme à deux chaînes. Cependant, contrairement au plasminogène, le tPA monocaténaire est actif et l'activité du tPA monocaténaire et bicaténaire est comparable (Rijken, Hoylaerts and Collen, 1981).

L'activité catalytique du tPA est intrinsèquement faible, mais elle est considérablement augmentée, jusqu'à un facteur 100, en présence de fibrine (Hoylaerts *et al.*, 1981). Cela se produit par la liaison du tPA et du plasminogène, à la fibrine, qui se comporte à la fois comme substrat mais aussi comme cofacteur, engendrant sa propre régulation négative. Au cours de la fibrinolyse, deux phases peuvent alors être distinguées. La première phase concerne le tPA qui active le plasminogène sur le réseau de fibrine encore intact. La seconde phase s'enclenche lorsque la fibrine est déjà partiellement dégradée par la plasmine et lorsque des sites de liaison pour le plasminogène sont exposés, en raison de la génération de résidus de lysine. Ces lysines libérées se lient aux domaines *Kringle* présents au sein des structures du plasminogène et du tPA pour promouvoir la fibrinolyse (Gebbink, 2011).

3.4.1. Relation entre fibrinolyse et inflammation : la place de la plasmine

La fibrinolyse possède un rôle important sur l'état inflammatoire. Outre son implication pour la dégradation de la fibrine et l'élimination des caillots sanguins, la plasmine est également reconnue comme un puissant modulateur des processus immunologiques (Draxler, Sashindranath and Medcalf, 2017) (**Figure 24**). En interagissant directement avec divers types cellulaires, notamment les cellules de l'immunité innée comme les monocytes, macrophages et DCs, ou les cellules du système vasculaire (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses), la plasmine se place à l'interface de deux grands systèmes de la biologie : l'hémostase et le système immunitaire.

3.4.1.1. Rôle de la plasmine dans la production de cytokines pro-inflammatoires

De récentes études soulignent l'importance des fonctions de la plasmine, indépendantes de la fibrine, lors de l'inflammation, mais aussi lors de sa phase de résolution. Tout d'abord, la plasmine est capable d'induire une signalisation pro-inflammatoire médiée par la liaison à ses récepteurs à la surface des leucocytes ou des cellules du compartiment vasculaire (Syrovets, Lunov and Simmet, 2012). Les récepteurs de la plasmine sont partagés avec le plasminogène et comptent l'annexine II, l'α-énolase, les histones H2B, PLG-RKT, mais encore, des intégrines qui

sont exprimées en grande quantité sur les leucocytes. C'est en partie grâce à ses sites LBS que la plasmine interagit avec ses récepteurs *via* des résidus de lysine (Plow, Doeuvre and Das, 2012; Godier and Hunt, 2013). La plasmine exerce un rôle pro-inflammatoire de par l'activation de monocytes, dépendante de l'engagement des récepteurs du plasminogène et, conséquemment, de la signalisation engendrée (Syrovets and Simmet, 2004). Elle est capable de stimuler la voie NF-κB, entraînant la libération, par les monocytes, de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF ou l'IL-1, mais aussi, la génération de FT (Syrovets *et al.*, 2001) (**Figure 24**). Il est intéressant de noter, qu'*a contrario*, l'activation de NF-κB dans les DCs, n'entraîne pas d'augmentation de l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires, mais augmente la production de CCL20, hautement chimiotactique pour les lymphocytes (Li, Syrovets and Simmet, 2012). D'autre part, les MoDCs humaines traitées à la plasmine induisent la différenciation des LT vers un phénotype Th1 (Li *et al.*, 2010). Cette sérine-protéase participe aussi au recrutement des monocytes. En effet, en stimulant la voie de signalisation de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), qui est la principale voie de signalisation contrôlant l'expression de gènes pro-inflammatoires, elle induit la libération de la protéine *monocyte chemoattractant* 1 (MCP-1) (Burysek, Syrovets and Simmet, 2002).

Indépendamment de l'activation leucocytaire, la plasmine est également impliquée dans la stimulation des cellules musculaires lisses. Elle entraîne leur prolifération de manière dépendante des MMPs et de l'EGF, contribuant ainsi à l'athérogenèse (Nicholl *et al.*, 2005; Roztocil *et al.*, 2005).

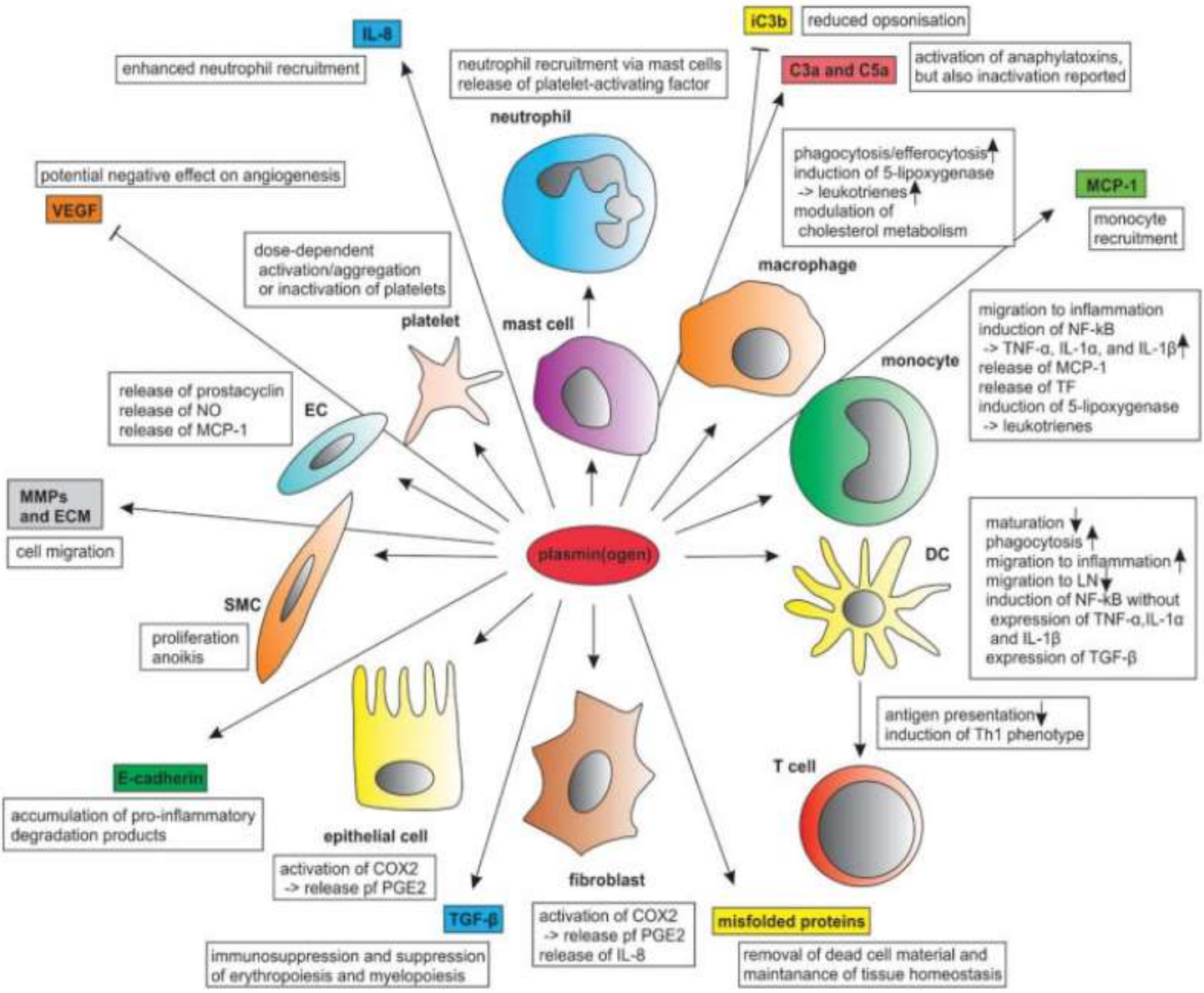


Figure 24 : Rôles multiples de la plasmine dans l'inflammation.
La plasmine est une protéase pléiotrope, agissant de diverses façons (immunitaires ou non) sur les processus inflammatoires. Elle interagit à la fois, avec les populations cellulaires, ainsi qu'avec les médiateurs du système immunitaire. LN : lymph nodes ; COX2 : cyclooxygenase 2 ; PGE2 : prostaglandin E2 (Draxler et al., 2017).

De surcroît, au cours de la différenciation des monocytes en macrophages, l'expression de récepteurs du plasminogène, tels que l'α-énolase ou l'annexine II, augmente de troi à quatre fois, notamment de manière dépendante du calcium (Das, Pluskota and Plow, 2010). Par exemple, l'annexine II possède une plus grande affinité pour la plasmine que les autres récepteurs lorsqu'elle est hétérotétramérisée au S100A10, une protéine de liaison au calcium (Kwon *et al.*, 2005). Les cellules endothéliales expriment également le complexe annexine II-S100A10 qui constitue un cofacteur pour l'activation du plasminogène par le tPA à la surface cellulaire (Dassah

et al., 2009; Flood and Hajjar, 2011). De plus, la plasmine peut auto-réguler la fibrinolyse *via* un mécanisme de rétrocontrôle négatif impliquant la modulation protéolytique de l'annexine II, entrainant la dissociation de S100A10 (He *et al.*, 2011). À travers son lien avec l'inflammation, la plasmine est impliquée dans diverses pathologies.

3.4.1.2. Différentes maladies inflammatoires impliquant la plasmine

La plasmine possède la propriété de moduler la réponse inflammatoire à différents niveaux (**Figure 25**). Son rôle a été mis en évidence dans l'angio-œdème héréditaire. Cette pathologie se manifeste par un gonflement localisé affectant les tissus sous-cutanés ou sous-muqueux et est lié à une libération excessive de bradykinine, une substance douée de propriétés vasodilatatrices. La maladie est initiée par l'activation du FXII de la voie intrinsèque qui ensuite active la cascade kallikréine-kinine aboutissant à la libération de bradykinine (Maas, 2019). Dans ce mécanisme physiopathologique, la plasmine joue un rôle prépondérant car elle permet également de générer de la bradykinine à partir du kininogène. Certaines formes d'angio-œdèmes héréditaires, anciennement nommées de type III, sont causées par des mutations gain de fonction dans les gènes qui codent respectivement pour le facteur XII ou le plasminogène. Il se trouve que le facteur XII et le tPA, possèdent des structures, mais également des fonctions homologues, puisque tous deux sont en capacité d'activer le plasminogène en plasmine (Maas and Renne, 2018; Maas, 2019). Les phases de poussées de la maladie ont été corrélées à l'augmentation de l'activation du plasminogène. Le terme de « *plasminflammation* » a récemment été inventé afin d'illustrer la fonction de la plasmine, au cœur de l'inflammation (Maas, 2019).

De plus, la plasmine peut agir comme médiateur pro-inflammatoire, comme cela a été rapporté dans une étude menée *in vivo* dans un modèle murin de syndrome d'activation macrophagique (SAM). Ce syndrome se traduit par la survenue d'un orage cytokinique responsable d'une dysfonction de divers organes. Le modèle de SAM est induit en activant les macrophages avec un agoniste du TLR-9 et de la D-Galactosamine. Dans ce modèle, l'inhibition de la plasmine réduit le taux de cytokines inflammatoires et les symptômes de la maladie. Les auteurs émettent l'hypothèse que la plasmine amplifie le signal du TLR-9 et notamment la voie NF-κB (Shimazu *et al.*, 2017).

En conditions inflammatoires, les macrophages activés produisent des pro-MMPs ainsi que des activateurs du plasminogène. Le plasminogène est converti en plasmine qui a la capacité de cliver les pro-MMPs pour les rendre effectrices. De concert, la plasmine et les MMPs vont dégrader la MEC, ce qui, en fonction du contexte pathologique étudié et des MMPs impliquées, aura une incidence plutôt pro- ou anti-inflammatoire (Carmeliet *et al.*, 1997; Fingleton, 2017). Dans un modèle murin de maladie inflammatoire chronique de l'intestin, il a été démontré que l'inhibition de la plasmine empêche la progression de cette pathologie, en partie, *via* la suppression des MMP-9 (Munakata *et al.*, 2015). En utilisant des animaux déficients en MMP-9, les auteurs ont montré une forte diminution du TNF circulant. Cette forte diminution peut s'expliquer par le fait que les MMP-9 sont capables de cliver la forme membranaire du TNF pour libérer sa forme soluble (Munakata *et al.*, 2015).

Compte tenu du rôle pro-inflammatoire largement admis de la plasmine, d'autres études ont évalué l'effet de son inhibition pour prévenir l'immunosuppression délétère qui peut survenir après des évènements traumatiques. Chez des patients ayant subi une chirurgie cardiaque, l'administration post-opératoire d'acide tranexamique, un inhibiteur du clivage du plasminogène, réduit le taux d'infections post-opératoires. De plus, chez ces patients ainsi que chez les volontaires sains, il a été observé, parmi les cellules circulantes, une diminution de LT $CD4^+$ et $CD8^+$ mémoires, de LTregs, ainsi qu'une réduction de l'expression du HLA-DR (MHCII) sur les leucocytes. En parallèle, une augmentation de NK, de monocytes et DCs activés est aussi retrouvée. Ces données suggèrent que l'inhibition de la plasmine atténue l'immunosuppression induite après une opération chirurgicale (Draxler *et al.*, 2019).

En conclusion, la plasmine est reconnue pour son implication conséquente dans les processus physiologiques et physiopathologiques, qui est au moins en partie, médiée par des récepteurs communs avec le plasminogène et présents à la surface des leucocytes et des cellules résidentes des tissus (Hastings, Myles and Medcalf, 2021). La modulation de l'inflammation par la plasmine réside principalement en l'initiation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Hastings, Myles and Medcalf, 2021). La plasmine est engagée dans les processus inflammatoires mais également dans le remodelage de la MEC qui participe à la cicatrisation des plaies et la restauration de l'intégrité tissulaire (Rømer *et al.*, 1996) (**Figures 24 et 25**).

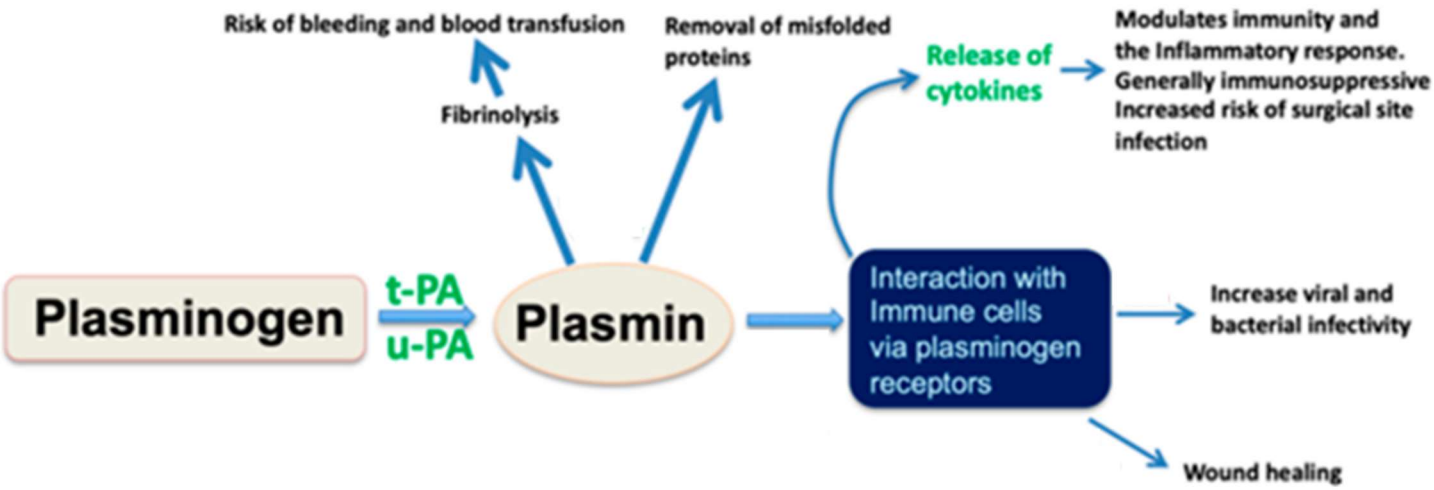


Figure 25 : Fonctions pléiotropes de la plasmine.
La génération de plasmine à partir de son précurseur, le plasminogène, est possible grâce aux activateurs du plasminogène, le tPA et l'uPA. La plasmine une fois formée clive la fibrine et d'autres protéines dont la conformation tridimensionnelle n'est pas optimale. Une génération excessive de plasmine entraîne une hyperfibrinolyse, ce qui augmente le risque de saignement et les besoins en transfusion sanguine. La plasmine peut également s'activer à la surface des cellules, y compris les cellules immunitaires, via des récepteurs du plasminogène. Cela peut entraîner la libération de diverses cytokines avec des effets ultérieurs sur l'inflammation et l'immunité. (figure adaptée de Hastings et al., 2021).

3.5. Le mode d'action non protéolytique du tPA : effet « cytokine-*like* » *via* des récepteurs spécifiques

Grâce aux différents domaines qui le compose, le tPA peut interagir avec une variété de protéines et de récepteurs et médier des effets « cytokine-*like* ». C'est au sein du cerveau que ces fonctions ont été majoritairement étudiées (Docagne *et al.*, 2015).

3.5.1. *Via* les récepteurs LRPs

Le tPA provoque d'autres effets qu'il induit par interaction avec différents récepteurs, en surface de diverses cellules. Par exemple, sont présents à la surface de cellules endothéliales, des récepteurs LRPs. Les LRPs sont des récepteurs *scavengers* qui se lient à une variété de ligands. Ils sont principalement impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines, d'où ils tiennent leur nom. D'autre part, ces récepteurs participent également à la clairance d'inhibiteurs de protéases dans le cerveau adulte (Bu *et al.*, 1992). Il s'avère que les cellules endothéliales qui constituent la barrière hémato-encéphalique (BHE) sont pourvues de ces LRPs qui ont la capacité d'interagir avec le tPA. Lorsque le tPA s'y fixe, il induit l'activation de la voie NF-κB, qui enclenche l'activation des MMP-3 et -9, qui à leur tour, dégradent les protéines matricielles, favorisant la perméabilité de la BHE

(Benchenane *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2009). De plus, le tPA peut se fixer sur les LRPs présents au niveau des astrocytes qui bordent et soutiennent la BHE. La conséquence est alors le détachement des pieds astrocytaires de la BHE. *In fine*, cela altère la perméabilité de cette barrière physique entre la circulation systémique et le cerveau (Wang *et al.*, 2006; Polavarapu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Ces effets appuient donc un rôle des LRPs en tant que récepteur du tPA, ainsi qu'un rôle du tPA indépendant de la plasmin(ogène).

3.5.2. *Via* les récepteurs NMDA

Plusieurs études ont montré que les inhibiteurs du tPA présents dans le SNC peuvent protéger les neurones contre la toxicité induite par la sur-activation des récepteurs NMDA (Buisson *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2002). Cela suggère que le tPA peut favoriser la neurotoxicité en agissant sur les récepteurs NMDA. Il est admis que la potentialisation de la signalisation des récepteurs NMDA par le tPA est soutenue par des effets dépendants et indépendants de son activité protéolytique (Nicole *et al.*, 2001; Pawlak and Strickland, 2002; Matys *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2009). À noter, les LRPs peuvent jouer le rôle de corécepteurs pour le tPA dans la signalisation des récepteurs NMDA. En effet, le tPA agit comme un ligand, engageant les récepteurs LRPs, qui à leur tour augmentent le calcium produit par l'activation des récepteurs NMDA (Samson *et al.*, 2008).

3.5.3. *Via* l'annexine II ou les récepteurs à l'EGF

Plusieurs études *in vitro* ont rapporté des effets anti-apoptotiques du tPA sur les neurones et les progéniteurs d'oligodendrocytes (Liot *et al.*, 2006; Polavarapu *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2011). Deux candidats ont été proposés comme récepteurs médiateurs de ces effets : l'annexine II et le récepteur à l'EGF. L'annexine II médie ces effets du tPA dans les neurones. Tandis que les récepteurs à l'EGF soutiennent ces effets au niveau des précurseurs d'oligodendrocytes, ce qui favorise la protection de la substance blanche après ischémie cérébrale (Lee *et al.*, 2007; Correa *et al.*, 2011).

Enfin, des conséquences similaires de l'interaction du tPA avec l'un ou l'autre de ces récepteurs peuvent être observées. Par exemple, la liaison du tPA aux récepteurs LRPs, ou à l'annexine II, favorise l'activation de la microglie, des macrophages résidents du SNC (Siao and Tsirka, 2002; Zhang *et al.*, 2009).

3.6. La régulation du tPA dans l'organisme

La fibrinolyse médiée par le tPA est contrôlée par deux mécanismes inhibiteurs distincts, agissant soit, sur l'activité protéolytique de l'enzyme, soit sur sa capacité à se lier aux résidus de lysine *via* son LBS (Yaron *et al.*, 2021) (**Figure 26**).

3.6.1. Le TAFI

Le TAFI est une carboxypeptidase qui contrecarre l'activité fibrinolytique du tPA, ainsi que sa liaison à l'annexine II, en éliminant les lysines activatrices (Bouma and Meijers, 2003). Cela atténue alors la génération de plasmine, stabilise les thrombus de fibrine et établit la régulation de l'interaction coagulation-fibrinolyse.

3.6.2. Les PAI

Trois principaux inhibiteurs directs du tPA sont connus, il s'agit des PAI-1 et -2, ainsi que la neuroserpine, spécifique du cerveau. Ces trois inhibiteurs sont tous membres de la famille des serpines, caractérisées par leur habileté à inhiber l'activité protéolytique des sérine-protéases. Les serpines inhibent les protéases en agissant comme substrat. Leur clivage entraîne une liaison covalente de l'inhibiteur et de la protéase. Un troisième PAI est rapporté dans la littérature : PAI-3, un inhibiteur des CRP. Cependant, aucun rôle physiologique dans la régulation du tPA ne lui est attribué à ce jour (Gebbink, 2011).

PAI-1 est la serpine majoritairement retrouvée dans le plasma où elle est sécrétée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les plaquettes (Sprengers and Kluft, 1987). L'inhibition du tPA est permise par l'interaction de PAI-1 avec ses domaines *Finger* et *Kringle*-2, bloquant ainsi sa fixation à la fibrine (Kaneko *et al.*, 1992).

3.6.3. La PN-1

La protéase nexine 1 (PN-1) est exprimée dans de nombreux tissus au cours du développement, notamment au niveau du cartilage, des poumons, de la peau, du tractus uro-génital, ainsi que dans le SNC (Mansuy *et al.*, 1993). PN-1 est présente en très faible quantité dans le plasma circulant. Néanmoins, elle est synthétisée de façon endogène et stockée en abondance dans les granules sécrétoires des plaquettes, à partir desquelles elle est rapidement libérée lors

de la phase d'hémostase primaire (Boulaftali *et al.*, 2010). Les interactions du tPA avec PN-1 sont trois fois plus faibles que celles du tPA avec PAI-1. Cependant, des études *in vivo* ont démontré que PN-1 est apte à inhiber à la fois, le tPA lié à la fibrine, mais aussi l' « auto-activation » du plasminogène par la plasmine liée à la fibrine (Boulaftali *et al.*, 2011).

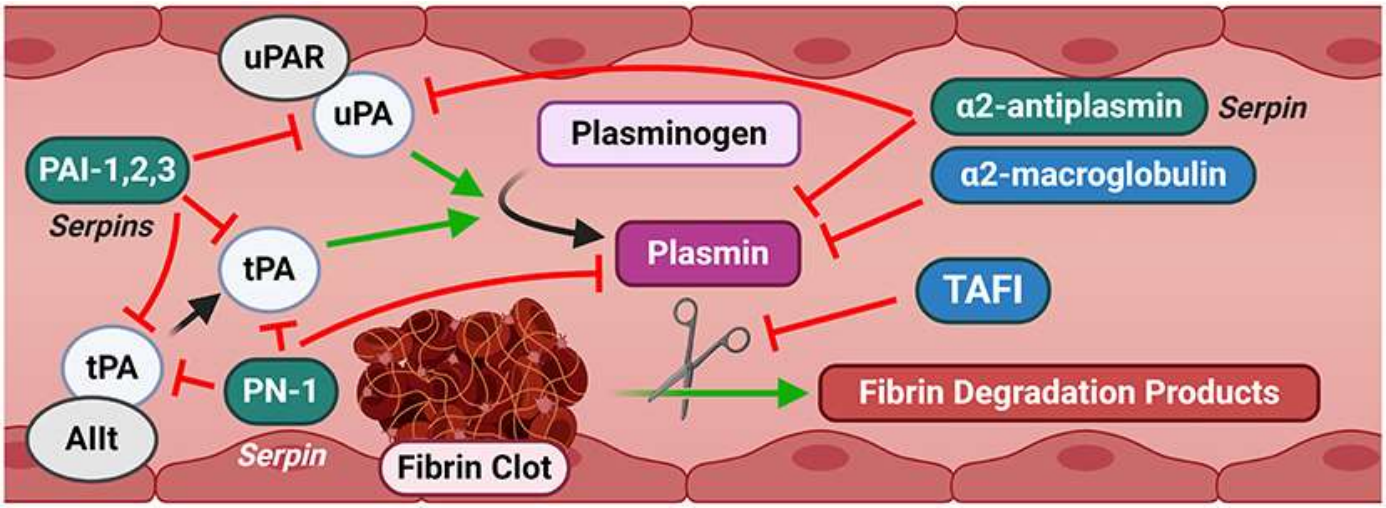


Figure 26 : Régulation de la fibrinolyse.
La fibrinolyse est caractérisée par la dégradation d'un caillot de fibrine en produits de dégradation, par l'action de la plasmine. La plasmine est générée grâce au clivage du plasminogène par l'uPA ou le tPA. Plusieurs serpines et autres inhibiteurs assurent une régulation étroite de cette cascade. Un lien existe à travers plusieurs éléments de la voie fibrinolytique, fournissant des contrôles redondants contre une activation inappropriée. AIIt : tétramère d'annexine II ; uPAR : récepteur de l'uPA (Yaron et al., 2021).

3.7. Exemples d'implication du tPA dans l'inflammation

Le tPA est impliqué dans l'inflammation. Sa fonction a été plus particulièrement étudiée dans trois contextes : les infections, la neuroinflammation, ainsi que dans des maladies rénales chroniques.

3.7.1. tPA et infections

L'étude du rôle du tPA a été réalisée dans différents modèles d'infections et a abouti à des résultats hétérogènes. Par exemple, il a été démontré que des bactéries de la famille des spirochètes étaient à la fois capables de capturer à leur surface du plasminogène circulant et d'induire la production de tPA par les cellules endothéliales. La plasmine générée à partir de plasminogène favorise la dégradation de la MEC et la progression de l'infection (Fernandes *et al.*, 2016). En utilisant des souris déficientes pour le tPA, Renckens et collaborateurs ont montré que

la sérine-protéase est protectrice dans un modèle de péritonite induit par *Escherichia coli*. Le mécanisme mis en jeu n'est pas clairement identifié mais impliquerait une sécrétion accrue de cytokines, telles que l'IL-6 ou l'IL-10, ainsi qu'une migration de neutrophiles au niveau du péritoine (Renckens *et al.*, 2006). La même équipe de recherche a démontré que la surexpression *in vivo* de tPA, à l'aide d'un adénovirus, augmente la survie des animaux infectés par *Klebsiella pneumoniae* (Renckens *et al.*, 2008).

À l'inverse, un rôle délétère du tPA a été pointé dans un modèle de septicémie par l'infection de Staphylococcus aureus. L'hypothèse retenue est qu'une synthèse importante de plasmine induisant une production excessive de cytokines inflammatoires est à l'origine de lésions tissulaires (Guo *et al.*, 2011).

3.7.2. La neuroinflammation

Les récepteurs NMDA sont présents sur les neurones, mais aussi à la surface des cellules endothéliales (Reijerkerk *et al.*, 2010). En se liant aux récepteurs NMDA à la surface des cellules endothéliales, le tPA est impliqué dans la modification de la perméabilité de la BHE. Ce phénomène est associé à une infiltration leucocytaire dans le parenchyme cérébral, notamment l'infiltration de monocytes circulants (Hiu *et al.*, 2008; Reijerkerk *et al.*, 2008). Il a été démontré que lorsque l'interaction du tPA sur les récepteurs NMDA endothéliaux était bloquée, la transmigration cellulaire à travers la BHE était réduite (Reijerkerk *et al.*, 2010). Le même résultat a été observé par antagonisation des récepteurs NMDA avec ajout de tPA, ou, par blocage de l'activité du tPA en présence de récepteurs NMDA fonctionnels (Macrez *et al.*, 2016). Enfin, l'infiltration de cellules immunitaires dans le SNC est également favorisée par le tPA qui induit l'expression de la molécule d'adhérence ICAM-1 facilitant le processus de diapédèse leucocytaire et accentuant la neuroinflammation dans l'EAE, un modèle murin de sclérose en plaques (Wang *et al.*, 2014).

3.7.3. Les maladies rénales chroniques

De nombreuses études ont démontré le rôle du tPA dans l'initiation et la progression de maladies rénales chroniques (Hu, Mars and Liu, 2008). Les principales caractéristiques de ces pathologies sont médiées *via* des mécanismes inflammatoires, induisant l'accumulation de tissus fibrotiques et la détérioration progressive de la fonction rénale.

Il a été décrit au niveau rénal que l'augmentation du taux de tPA provoque l'activation de NF-κB au sein des macrophages (Hu, Mars and Liu, 2008; Lin, Wu and Hu, 2012). Ceux-ci contribuent à l'inflammation chronique et à la fibrose en produisant des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissance et des ROS, substances qui activent alors les fibroblastes et les cellules productrices de MEC (Liu, 2011). Les mécanismes d'activation des macrophages sont médiés par les récepteurs à l'annexine II et le CD11b qui, de manière autonome ou couplée, transmettent un signal qui active la voie NF-κB. Ainsi, la signalisation NF-κB induite par le tPA, entraîne une motilité accrue, ainsi qu'une polarisation des macrophages de type M1 et, finalement, une inflammation rénale.

Les exemples de maladies ou de troubles caractérisés par la présence de tPA illustrent son rôle en tant que médiateur de l'inflammation en dehors du système fibrinolytique. Impliqué majoritairement dans cette étape de l'hémostase, le tPA est lié aux associations hémostase-inflammation, dont les relations de causes à effets sont multiples et réciproques (Del Vecchio *et al.*, 2014) (Figure 22). Il est donc intéressant de ne plus uniquement le considérer comme la sérine-protéase du processus final d'hémostase, mais aussi comme un acteur à part entière de l'inflammation.

De nombreuses études se sont intéressées aux multiples rôles directs ou indirects du tPA dans l'immunité et l'inflammation. Nous avons synthétisé dans une revue les fonctions marquantes et récentes reliant le tPA à la réponse immunitaire.

III. Rôles du tPA dans la réponse immunitaire

Dans cette partie d'introduction de thèse, nous faisons une revue de la littérature des divers rôles du tPA dans la réponse immunitaire. Cette revue, dont je suis premier auteur, a fait l'objet d'une publication dans le journal *Cellular Immunology*. Avec celle-ci, nous apportons un lien direct entre la première partie de l'introduction, portée sur un état de l'art du système immunitaire inné et la deuxième partie de l'introduction orientée sur le lien entre l'hémostase et l'inflammation.

Cellular Immunology 371 (2022) 104451

Contents lists available at ScienceDirect

Cellular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ycimm

Review article

Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response

Célia Seillier [a], Pauline Hélie [a,1], Gautier Petit [a,b], Denis Vivien [a,c], Diego Clemente [d], Brigitte Le Mauff [a,b], Fabian Docagne [a], Olivier Toutirais [a,b,*]

[a] Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, France
[b] Department of Immunology and Histocompatibility (HLA), Caen University Hospital, CHU Caen, France
[c] Department of Clinical Research, Caen University Hospital, CHU Caen, France
[d] Grupo de Neuroinmuno-Reparación, Hospital Nacional de Parapléjicos, Finca La Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Tissue-type plasminogen activator
Plasminogen activation system
Plasmin
T cells
Antigen presenting cells
Macrophages
Immunopathology

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has once again brought to the forefront the existence of a tight link between the coagulation/fibrinolytic system and the immunologic processes. Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease with a key role in fibrinolysis by converting plasminogen into plasmin that can finally degrade fibrin clots. tPA is released in the blood by endothelial cells and hepatocytes but is also produced by various types of immune cells including T cells and monocytes. Beyond its role on hemostasis, tPA is also a potent modulator of inflammation and is involved in the regulation of several inflammatory diseases. Here, after a brief description of tPA structure, we review its new functions in adaptive immunity focusing on T cells and antigen presenting cells. We intend to synthesize the recent knowledge on proteolysis- and receptor-mediated effects of tPA on immune response in physiological and pathological context.

1. Introduction

Host defense against pathogens requires the activation and recruitment of specialized immune cells. Firstly, innate immune response is quickly triggered in the tissues by the direct recognition of a broad range of conserved microbial molecules named "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) that are recognized by specific pattern-recognition receptors (PRR) mainly expressed by innate cells. The toll-like receptor (TLR) family represents the prototype of PRR and is able to recognize various bacterial, fungal or viral products. Recognition of microbial structure by TLR triggers the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines that drive the recruitment of innate cells (neutrophils and macrophages) involved in the immediate clearance of pathogens by phagocytosis. As antigen-presenting cells (APCs), macrophages and dendritic cells (DCs) that express a high level of costimulatory molecules participate in the activation of the adaptive immunity by interacting with lymphocytes. The two types of lymphocytes of the adaptive immunity are T and B cells, both of which harboring a distinct antigen-specific receptor: T cell receptor (TCR) and B cell receptor (BCR), respectively. In the secondary lymphoid organs, APCs process and present antigens associated with major histocompatibility complex (MHC) molecules on their surfaces to $CD4^+$ helper T (Th) cells or $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes (CTLs). The immune homeostasis is tightly regulated by cell–cell interactions and cytokine signals. Th1 cells secrete mainly IFN-γ and play important roles in the protection against intracellular pathogens, while Th2 cells secrete IL-4 and are involved in the response against helminths. T follicular helper cells (Tfh) cells express IL-21 and play a major role in T cell-dependent B cell responses. Th17 cells produce high amounts of IL-17 and contribute to inflammation by regulating neutrophils. B cells are directly activated by antigen binding and differentiate into antibody-secreting plasma cells.

For several years now, links between hemostasis, especially fibrinolysis, and immune processes are well-established [1,2]. Plasminogen (PLG) activator system consists of a group of proteases and protease inhibitors regulating the conversion of the zymogen PLG into the active serine protease plasmin, the principal enzymatic mediator of fibrinolysis. Plasminogen (PLG) activator system plays also a role in wound healing, extracellular matrix (ECM) degradation and cell migration [2]. The plasminogen activators – both tissue-type (tPA) and urokinase-type (uPA) – and their main inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1

* Corresponding author at: Inserm U1237, PhIND, Institut BB@C, Centre Cyceron, BP5229, 14074 Caen Cedex, France.
E-mail address: toutirais-o@chu-caen.fr (O. Toutirais).
[1] Present address: Theodor Kocher Institute, University of Bern, Freiestrasse 1, CH-3012 Bern, Switzerland.

https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104451
Received 20 August 2021; Received in revised form 6 October 2021; Accepted 29 October 2021
Available online 6 November 2021
0008-8749/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

(PAI-1), play a key role in the regulation of fibrinolysis.

In addition to its role in the degradation of fibrin, tPA also modulates inflammatory response to tissue injury in various disease conditions such as ischemic brain injury and chronic kidney disease [3,4]. For instance, in cerebral ischemic models, tPA promotes microglial activation and the recruitment of neutrophils [5,6]. In renal inflammation model, tPA stimulates the NF-kb pathway in macrophages leading to their infiltration and activation in kidney parenchyma [7]. More recently, a new role of tPA in the adaptive component of the immune response was brought out in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the commonly used model of multiple sclerosis; and in experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG), two mouse models of *T*-cell and B-cell-mediated autoimmune diseases, respectively [8-10].

tPA acts *via* its protease activity but also as a cytokine and binds cell surface receptor including the Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), Annexin A2 and the *N*-Methyl-D-Aspartate receptor [1,3].

In this review, we recapitulate the role of tPA in some aspects of the inflammatory response –migration of immune cells and activation of mononuclear phagocyte cells – and highlight some emerging concepts that expand its role to the adjustment of the adaptive immunity, especially T cell functions and interactions with APCs. We also emphasize the role of tPA in several immune diseases.

2. Background on tPA structure and regulation

Historically, tPA is described as a serine protease produced and released by endothelial cells in the blood stream [11]. Endothelial cells are described as the major source of tPA but the distribution of the serine protease is more extended and includes brain cells, hepatocytes, smooth muscle cells, epithelial cells and immune cells such as macrophages, mastocytes or lymphocytes [12-19]. In human, tPA is composed of 527 amino acids for a molecular weight of 69 kDa and is encoded by the *Plasminogen Activator Tissue type* (PLAT) gene on chromosome 8 [20]. tPA is secreted as preproprotein (single chain molecule) and proteolytically processed by plasmin or trypsin to generate heavy and light chains (two-chain molecule). tPA is a major modulator of the thrombolytic pathway. Its activation leads to the generation of plasmin, an enzyme that ensures the degradation of fibrin, the cleavage of ECM components and the activation of matrix metalloproteinases (MMPs) [21,22].

tPA is composed of five different domains, four of which are localized in the heavy chain. The finger domain, also called fibronectin domain is responsible for the binding of fibrin and enables the formation of a ternary complex with PLG [23,24]. This domain is also involved in the interaction with the Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), resulting, for instance, in the clearance of tPA by hepatic cells or astrocytes [25], or its transcytosis by endothelial cells [26]. The finger domain is also known to bind the membrane receptor Annexin A2, playing a role in microglial activation, cell migration and neoangiogenesis [27,28]. The Epidermal Growth Factor (EGF)-like domain has structural homologies with the growth factor EGF and induces signaling through binding to EGF receptor (EGFR) [29,30]. The tPA-EGFR interaction results in cell proliferation and mobility, and inhibits apoptosis [30,31]. The function of the Kringle 1 domain is poorly understood. It was shown that glycosylation in Asp_{117} increases tPA affinity to the mannose receptor and its uptake by endothelial cells [32]. The Kringle 2 domain presents a functional lysine-binding site (LBS) that supports the interaction between tPA and PLG [33]. Kringle 2 favors the activation of PLG by stabilizing the ternary complex comprising tPA, PLG and fibrin, initiated by the finger domain. Interaction of the Kringle 2 domain of tPA with Platelet-Derived Growth Factor C (PDGF-C) is needed for its cleavage into the active form PDGF-CC [34]. Moreover, the Kringle 2 domain is also involved in the binding to the GluN1 subunit of NMDAR promoting NMDA-induced calcium influx and neurotoxicity [35-37]. The last domain of tPA is the catalytic domain which ensures the conversion of PLG into plasmin, thanks to a catalytic triad on His_{322}, Asp_{371} and Ser_{478} [20].

tPA activity is tightly controlled by serine protease inhibitors, also called serpins. Four serpins are known to inhibit tPA: PLG activator inhibitor-1 (PAI-1), PAI-2, neuroserpin (NS) and protease nexin-1 (PN-1). Many cell types can produce these serpins, including vascular endothelial cells (PAI-1 and PN-1), keratinocytes (PAI-2), and neurons (NS) [38-40]. tPA inhibitors are also present in monocyte/macrophages but their expression in other immune cells is not well documented [41-43].

3. Role of the plasminogen activation system in migration and adhesion of immune cells

In order to carry out immunosurveillance against microorganisms, naive T cells circulate between secondary lymphoid organs (SLOs) and the blood *via* the lymph, while DCs traffic from tissues to the draining lymph nodes to present antigens. Antigen presentation requires the expression of specific adhesion molecules and chemokines to control the homing of the immune cells. For instance, CCR7 expression on naïve T cells and DCs is required for their migration towards SLOs [44,45]. Interestingly, plasmin – locally generated *via* the activation of PLG by tPA at the surface of T cells or DCs cleaves the chemokine CCL21 (C—C motif Chemokine ligand 21), one of the two ligands of CCR7, to generate a soluble form with chemotactic activity [46] (Fig. 1**A**). In addition, plasmin processes CCL21 bound at the surface of APCs and thereby prevents the tethering of T cells to APCs, that potentially limits the priming of T cells or their retention in SLOs [47]. Interestingly, *in vitro* studies indicate that plasmin also induces the release of CCL20 by human macrophages and DCs. Furthermore, CCL20 produced by macrophages promotes the chemotaxis of Th17 cells which expressed CCR6, the cognate receptor of CCL20 [48] (Fig. 1**B**). So, in a context where PLG activation is enhanced, excessive plasmin generation could favor the recruitment of pathogenic Th17 cells in tissues and consequently support chronic inflammation or autoimmune diseases. In addition, plasmin also promotes the chemotaxis of human DCs in transwell migration assay by acting on Annexin A2, triggering ERK1/2 and AKT2 signaling pathways [49].

Complementary to these effects on chemotaxis, tPA has also a role in immune cell motility. Adhesion of macrophages to fibrin *in vitro* is dependent on the interaction of tPA with the integrin MAC1 (CD11b/CD18) complexed with the receptor LRP1. The tPA inhibitor PAI-1 is necessary to macrophage migration by promoting MAC1 internalization and cell detachment [50]. tPA regulates the adhesion of T cells to brain endothelial cells and increases T cell migration *in vitro* [51]. To this end, tPA binds to the cell membrane receptor LRP1 on endothelial cells *via* a "cytokine-like" action to drive the up-regulation of the adhesion molecule intercellular adhesion molecules-1 (ICAM-1) (Fig. 1**C**). Of note, tPA effect is also observed *in vivo* since the intravenous administration of tPA enhances ICAM-1 expression on brain endothelial cells and is associated with a worsening of EAE, induced by immunization with a myelin antigen such as myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) [51]. These data indicate a contribution of tPA in *T*-cell mediated-immunopathology and neuroinflammation. In line with this, tPA regulates the transmigration of monocytes across endothelial cells by acting on the GluN1 subunit of NMDAR [52,53] expressed on endothelial cells [54,55] (Fig. 1**D**). This action leads to signaling events including the activation of the ERK1/2 pathway and the Rho/ROCK pathway, which drives the increase in endothelial permeability through the phosphorylation of myosin light chain [55]. Our group has demonstrated that blocking the action of tPA on GluN1 by using a monoclonal antibody (mAb, Glunomab®) reduces the *in vitro* transmigration of human T lymphocytes and monocytes [54]. Accordingly, *in vivo*, Glunomab® limits the severity of EAE disease by drastically reducing the leukocyte infiltration, including T cells, and the subsequent neural tissue inflammation and demyelination. This blockade of tPA action on endothelial GluN1 by Glunomab® occurs without modification of T cell activation measured with CD25

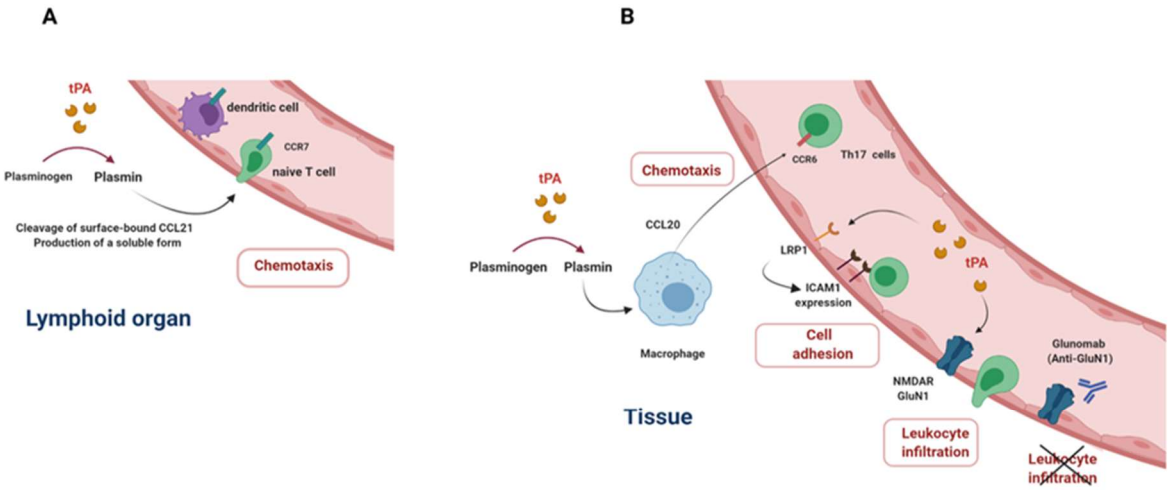


Fig. 1. Effects of the plasminogen activation system on migration and adhesion of immune cells. tPA is involved in the recruitment of immune cells by promoting the release of chemokines (A and B). tPA increases the expression of the adhesion molecule ICAM1 on endothelial cells by acting on the LRP1 receptor (C). tPA-NMDAR binding on endothelial cells facilitates diapedesis of leucocytes (D). The monoclonal antibody Glunomab limits the leucocyte infiltration by blocking the interaction between tPA and NMDAR.

and CD69 markers.

4. The role of tPA in T cell activity

The role of tPA in the T cell-mediated EAE model is still a matter of debate. Previous reports demonstrate an increase in tPA activity in EAE [56,57]. In addition, expression of tPA and its inhibitor PA1 transcripts are found in the sites of tissue damage and neuroinflammation suggesting an involvement of this serine protease in the EAE physiopathology [58]. Initially, Lu et al described that tPA$^{-/-}$ developed a more severe form of EAE but with a delayed onset in the disease [57]. Although most studies corroborated this finding and showed a protective role of tPA [8,56,59], others reported a detrimental function of tPA in the pathogenesis of EAE with either tPA deficiency which results in a

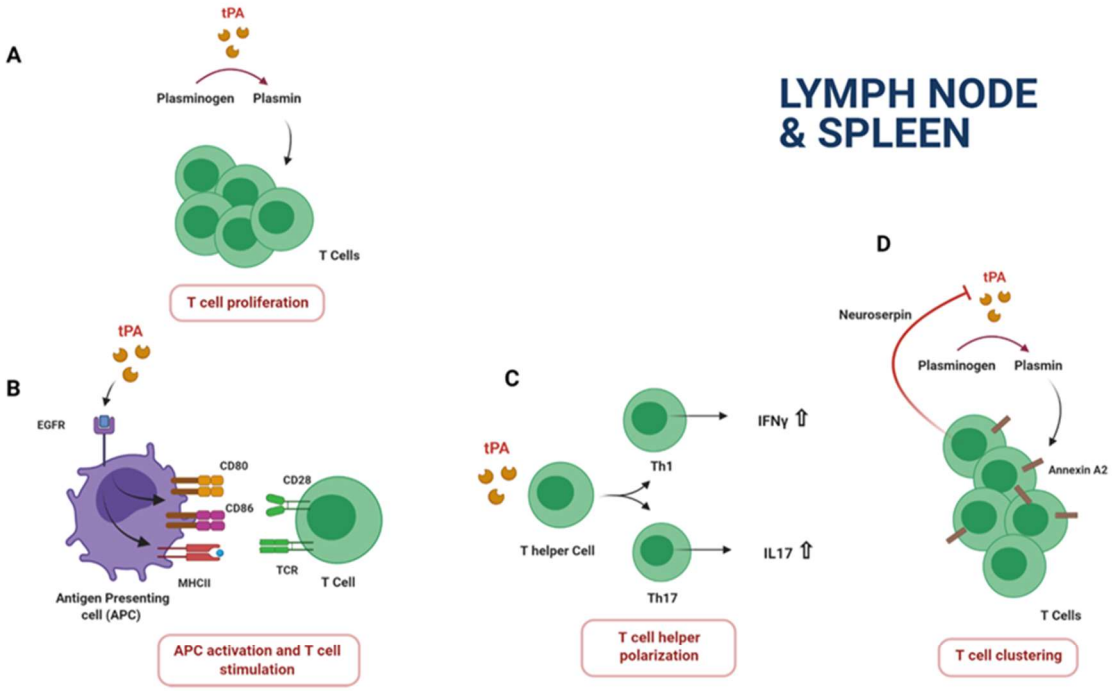


Fig. 2. Effects of the plasminogen activation system on T cell functions. tPA increases MHC-II and costimulatory CD80 and CD86 molecule expression on antigen presenting cells (dendritic cells and macrophages) by the binding of the EGF-R. T cell activation and proliferation is enhanced by tPA through its proteolytic action (A). tPA increases the production of the proinflammatory cytokines IFN-γ and IL-17 (B). tPA contributes to the T cell clustering by a plasmin dependent mechanism. This effect is reversed by neuroserpin (C).

less severe form of EAE or tPA administration that increases the severity of EAE [9,51]. These inconsistencies between several studies may be attributed to the differences in the experimental protocols including myelin antigen doses, sex and age of the animals or the number of immunizations/boosts. Moreover, variations in mouse housing or environmental factors such seasonal parameters may also influence the course of EAE. Since tPA also acts on neurological parameters such as blood brain barrier permeability, microglial activation or intra parenchymal fibrinolysis, the discrepant results observed in the studies may be the result of a differential range of immunological and non-immunological functions of tPA.

Recent data from our lab and Brenner's team have highlighted a novel role of tPA in T cell biology. *In vitro*, T cells from tPA $^{-/-}$ mice have a defect in proliferation following polyclonal or antigen-specific stimulation [9 10]. This effect concerns both CD4^{+} and CD8^{+} T cells and was reversed by addition of exogenous tPA. Conversely, tPA increases the expansion and activation status of T cells from wild type (WT) splenocytes in culture. tPA induces the same effect on purified T cells stimulated by anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies (Abs) indicating that APCs are dispensable to drive tPA-induced proliferation (Fig. 2**A**). We have demonstrated that stimulating action elicited by tPA on T cells implies its proteolytic properties and plasmin generation but not enhancement of NMDAR functions. The molecular target of plasmin is currently unknown but the matrix metalloproteinase 2 and 9 constitutes strong candidates. Indeed, these proteases are produced as inactive zymogens, pro-MMPs, which are activated by plasmin. Using pharmacological blockade approach and experiments with genetically-deficient cells, Benson et *al* show that MMP2 and 9 expressed by CD4^{+} and CD8^{+} T cells contribute to their proliferation and activation after polyclonal or antigen-specific stimulation [60].

Nevertheless, an indirect effect of tPA over T cell activity cannot be discarded. In fact, it has been observed a reduced proliferation of WT T cells *in vitro* following co-culture with MOG-loaded APCs from tPA $^{-/-}$ EAE mice pointing out a activating role of the serine protease in antigen presentation [8]. At least in part, this function of tPA is protease-dependent since T cell reactivity is reduced after treatment of EAE mice with mutant tPA without catalytic activity or PAI-1 inhibitor [8]. In addition, we also showed that initial PA pretreatment of splenocytes containing APCs, but depleted of T cells, potentiated antigen specific proliferation of T cells that have been added subsequently to the co-culture [9]. Since APC-mediated expansion of T cells importantly depends on the maturation state of APCs, we recently investigated the impact of tPA on the phenotype and functions of macrophages and DCs in the *T*-cell mediated EAE model [9]. tPA polarizes splenic macrophages and DCs from EAE mice towards a more mature phenotype by increasing MHC-II and the costimulatory molecules CD80 and CD86 expression. In addition, splenic APCs from EAE mice incubated with tPA have an increased capacity to stimulate encephalitogenic CD4^{+} T cells. Interestingly, these properties of tPA on APCs involve the EGF-R and are independent of both proteolytic activity and NMDAR activation (Fig. 2**B**). Furthermore, it has been described a reduction of CD4 + CD25 + Foxp3 + regulatory T cells (Tregs) among splenocytes of tPA $^{-/-}$ mice [8,10]. This reduction was more pronounced in EAE and EAMG tPA $^{-/-}$ mice indicating a potential role of tPA in the autoimmune process through an involvement of Tregs. Conversely, WT mice treated with PAI-1 inhibitor exhibited more Tregs.

Importantly, tPA also modulates the release of cytokines by immune cells. *In vitro*, tPA increases IL-6 and IL-10 secretion by activated splenocytes *via* a plasmin-dependent mechanism [9]. In addition, we also described that CD4^{+} T cells from tPA$^{-/-}$ EAE mice produced less IFN-γ than cells from WT EAE mice. Others showed that splenocytes from tPA$^{-/-}$ mice produce less IFN-γ, IL-17 and IL-10 than splenocytes from WT mice following antigen-specific stimulation [8] (Fig. 2**C**). Consistent with these data, it has been reported that splenocytes from mice deficient for the tPA inhibitor PAI-1 release more IFN- γ and IL-6 in response to the staphylococcal enterotoxin B superantigen [61]. Thus, tPA promotes proinflammatory Th1 and Th17 phenotypes but also increases the secretion of IL-10, mainly known as an immunoregulatory mediator. So, given the role of tPA in T cell activation, Treg biology and in the production of cytokines with pro-and anti-inflammatory properties, further studies are needed to conclude on the impact of tPA on the outcome of a specific immune response context *in vivo* [62].

Recent studies showed a role of the tPA inhibitor NS in T cell activation. Indeed, NS is expressed by resting T cells with a vesicular subcellular localization and is translocated to the immune synapse when T cells contact APCs. This suggests that NS may modulate signaling between T cells and APCs by regulating extracellular proteolysis [63]. Loef et *al* have investigated the role of tPA and its inhibitor NS in the T cell clustering, a phase that influences the T cell fate, especially after initial priming of T cells by APCs [19,64,65]. Authors report that inhibition of NS expression increases homotypic interactions and proliferation of activated T cells [19] (Fig. 2**C**). They also demonstrated that cell clustering is a plasmin-dependent mechanism that is mediated by cleaving Annexin A2 receptor and associated to modifications of the actin cytoskeleton through the activation of ROCK II pathway and myosin ATPase. Overall, the studies converge towards a role of tPA in favor of T cell activation. Further studies are needed to consolidate our knowledge about the role of tPA in T cell migration and activation and, more broadly, to determine potential involvement of tPA in the regulation of other T cell functions such as development and differentiation. The final challenge is to determine how tPA could impact T cell mediated immunity and immunopathology *in vivo*.

5. Role of tPA in an B cell-mediated autoimmune model

The role of tPA in the humoral response has been scarcely investigated in a mouse model of myasthenia gravis (MG). MG is an autoimmune disease mainly mediated by anti-acetylcholine receptor (AchR) autoAbs and is characterized by muscle weakness and fatigue in patients. In EAMG, tPA $^{-/-}$ mice showed a higher production of anti-AchR-autoAbs associated to increased levels of B-cell activating factor (BAFF), a molecule promoting B cell survival. This suggests that tPA may impede the development of antibody response, hypothetically by targeting directly B cells and/or indirectly anti-AchR Th cells [10]. Nevertheless, in this first study, disease score severity in EAMG is weak and associated with low level of autoAbs measured lately after immunization. Thus, understanding of the functions of tPA in B cell-mediated immunity requires other investigations.

6. Effects of tPA on mononuclear phagocyte cells

Monocytes/macrophages and DCs provide a critical link between innate and adaptive immunity and are key regulators of protective immune responses and tolerance to self-antigens. The efficient clearance of necrotic cells is an essential process for the prevention of autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus. Notably, works of Medcalf 's team identified a critical role of the PLG activator system in the phagocytosis of dead cells by DCs in homeostatic context [66]. *In vitro*, tPA and PLG increase the phagocytosis of dead cells by human DCs through a plasmin-dependent mechanism (Fig. 3**A**). Moreover, plasmin tends to maintain DCs into an immature phenotype, with a higher production of TGF-β and lower ability to elicit allogeneic response. This suggests that plasmin promotes immune tolerance by facilitating phagocytic function. Conversely, in another study, plasmin-stimulated human DCs trigger Th1 polarization of CD4^{+} T cells *in vitro* [49]. DCs are highly plastic cells and the variability in their isolation and culture conditions may affect their phenotypes and functions and so explain the divergent effects of plasmin in these two studies. Nevertheless, it would be especially relevant to determine the putative immunomodulatory role of plasmin in response to sterile tissue injury (e.g. stroke) *versus* infection disease settings in which DAMPs and PAMPs modulate the DCs functions and so impact adaptive immunity. Otherwise, it should be

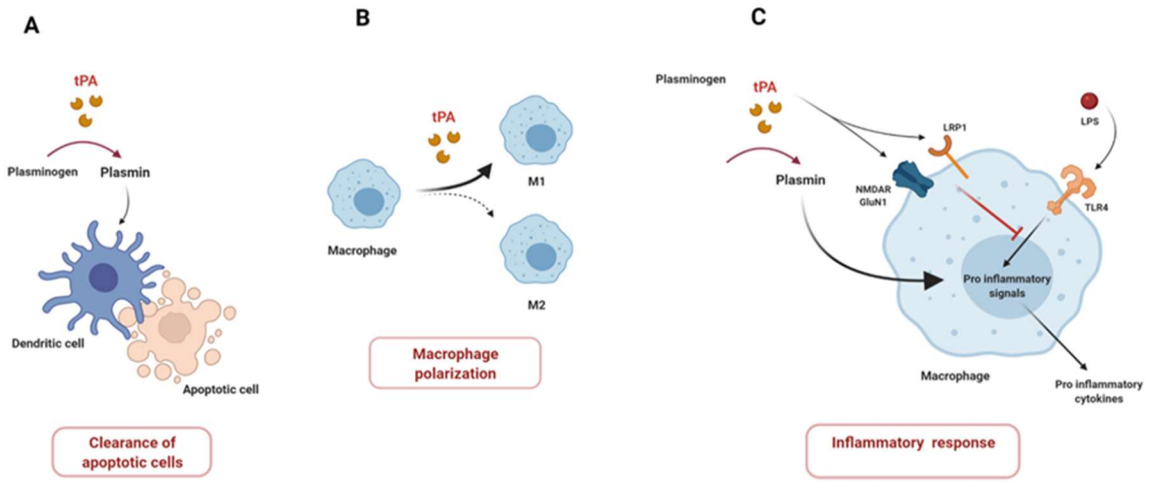


Fig. 3. Effects of the plasminogen activation system on mononuclear phagocyte cells. tPA promotes the clearance of apoptotic cells by dendritic cells (A). tPA is involved in the polarization of macrophages (B). tPA may have opposite effects on macrophage activation. tPA, as a plasmin activating protease, has a proinflammatory effects whereas tPA exerts anti-inflammatory effects via the binding to the NMDAR and LRP1 receptors.

noticed that inflammatory cytokines and PAMPs are known to enhance tPA expression, which could lead to an increase of plasmin generation and so modulate tolerogenic or immunogenic status of DCs [67].

Although DCs are considered the best professional APCs, it should be kept in mind that, in addition to their innate effector functions, macrophages are also key operators of adaptive immunity and immune tolerance. Generally, macrophages form a heterogeneous cell population and can be experimentally polarized into two major subtypes termed M1 and M2, although intermediate phenotypes also exist. M1 macrophages are involved in pro-inflammatory activities and are classically activated upon IFN-γ or LPS stimulation whereas alternatively activated M2 macrophages promote immunoregulation and tissue repair and are activated upon IL-4 and IL-13 stimulation [68]. Macrophages have the ability to polarize $CD4^+$ Th cells and to contribute to leukocyte recruitment at the site of infections *via* chemokine production [69]. For example, in the context of mycobacterial infection, a subset of macrophages drives Th17 polarization to the detriment of Th1 and Th2 cytokine production by T cells [70].

In a model of renal injury, tPA skews the polarity of macrophages and promotes phenotype and survival of M1 macrophages [71,72] (Fig. 3**B**) This shift of polarity requires the Annexin A2 receptor and the activation of the NF-κB pathway in macrophages. Conversely, PLG/plasmin injection in the pleural cavity induces the infiltration of macrophages with increased expression of the M2 markers CD206, arginase-1, and decreased the expression of the M1 marker, inducible nitric oxide synthase (iNOS) [73]. These M2 polarized macrophages contribute to the resolution of the inflammation by phagocyting apoptotic neutrophils.

Several reports point out an intriguing and complex role of the PLG activation system in the regulation of the inflammatory responses mediated by macrophages following PAMP stimulation [1]. In this context, opposite effects of tPA on inflammatory response are driven either by its cytokine or proteolytic functions. Indeed, by studying the role of LRP1 in inflammation, Mantuano et *al* showed that LRP1-deficient mice have an exacerbated response to LPS, a ligand of TLR4, with macrophages spontaneously exhibiting a proinflammatory phenotype [74]. Interestingly, tPA, which can act as a ligand of LRP1, inhibits the inflammatory profile of WT macrophages in presence of LPS [74]. This effect of tPA is mediated by NMDAR expressed by macrophages, likely in cooperation with LRP1, and does not require a protease activity [75]. Enzymatically inactive tPA also antagonizes the response of macrophages stimulated by TLR2 or TLR9 agonists but fails to alter nucleotide-binding oligomerization domain-1 (NOD1) and NOD2 receptor signaling [76].

Paradoxically, tPA, through the generation of plasmin, has pro-inflammatory properties. In human monocytes, plasmin directly induces the release of the cytokines IL-1 and TNF *via* the activation of the NF-κB pathway as well as the upregulation of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and the costimulatory molecule CD40 through p38 MAPK and Janus kinase (JAK)/STAT pathways [77,78]. Additionally, Ward et *al* have shown that LPS-induced response in macrophages is enhanced by plasmin [79]. In a mouse model of macrophage activation syndrome (MAS), a disease characterized by an uncontrolled activation and proliferation of T lymphocytes and macrophages causing multiorgan dysfunctions, plasmin potentiates the effect of TLR9 agonist and contributes to the increase of monocyte/macrophage infiltration and to the cytokine storm [80]. Of note, macrophages express the PLG receptor Plg-R_{kt}, associated with urokinase receptor uPAR [81]. It was shown that tPA could interact with Plg-R_{kt} to promote PLG activation and local plasmin generation. This pathway could increase the proinflammatory effects induced by plasmin [82]. So, these different studies highlight diverse and sometimes opposite effects of tPA *versus* plasmin in activation of macrophages by LPS *in vitro*. This inspired a recent study that demonstrated that tPA alone inhibits the macrophage response to LPS by a cytokine-like effect; while tPA increases the proinflammatory phenotype of macrophages *via* the generation of plasmin (Fig. 3**C**) [83].

Altogether, these findings indicate that PLG activation system regulates both aspects of the mononuclear phagocyte cell activation. Schematically, tPA acts as a pro-inflammatory mediator by its plasmin activating protease capability while tPA exerts anti-inflammatory effects when behaving as a cytokine. However, it must take into account that the phenotype and functions of macrophages and DCs result from dynamic processes in response to sequential signals from the local environment. In addition, analysis of phenotypic markers (eg MHC II or costimulatory molecules) do not always recapitulate the functions of myeloid cells. In this way, Menges *et al* have shown that injection of matured DCs in presence of TNF induced antigen-specific tolerogenic T cells in EAE model [84]. Furthermore, beyond the useful but maybe oversimplistic M1/M2 paradigm, intermediate and reversible myeloid cell phenotypes may coexist in tissues that could explain the apparently contradictory effects of tPA [85].

Some pieces of evidence show that tPA is involved in immune tolerance and adaptive immunity, mainly through the regulation of

macrophages and DC activity states and maturation. Nevertheless, additional studies are needed to better understand the function(s) of the different domains of tPA in these immunological processes, and their potential impact in immunological diseases, especially in condition where PLG activation system is enhanced.

7. Conclusion and perspectives

It is well established that tPA and related proteins are involved in various inflammation regulatory processes such as innate leukocyte activation and migration to the site of inflammation; and inflammatory mediator secretion. As reviewed above, recent studies indicate that tPA also emerges as an important player of the adaptive immune response. tPA plays a role in the motility and chemotaxis of T cells and APCs as well as their migration across the endothelial barrier. Fundamentally, tPA acts as an activating factor of the adaptive immune response by mediating T cell proliferation, activation and cytokine production and by shaping the functions of macrophages and DCs.

However, the impact of tPA on numerous functions of antigen-specific lymphocytes remains to be explored including priming, differentiation in effector or regulatory cells, and generation of memory immune response. This field is difficult to investigate using a standard immunization protocol with conventional mice, since the frequency of antigen-specific lymphocytes is usually low. The use of a transgenic TCR or BCR crossed with a tPA-deficient background could provide powerful tools to circumvent this limit *in vivo* and *in vitro*. Integrating more widely the study of tPA inhibitors in the future research is also necessary to have an overview of the PLG system in adaptive immunity. The contribution of tPA in autoimmune diseases has been underinvestigated. The studies with tPA-deficient mice have shown contradictory effects in EAE model and deleterious effects in EAMG model. Extended research concerning the relationships between tPA and adaptive immunity in the context of protective immunity, or immunopathology, may lead to the development of novel tPA-based therapeutic research axes in the future.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

All the figures were created with BioRender.com.

Funding information

This work was supported by grants from Regional Council of Normandy, the Etablissement Français du sang (EFS), the Association pour la Recherche sur la Sclérose En Plaques (ARSEP) and by the Instituto de Salud Carlos III-Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (PI18/00357; RD16-0015/0019, partially co-financed by F.E.D.E.R., European Union, "Una manera de hacer Europa".

Author contributions

CS, PH, GP, DB, DC, BL-M, FD and OT substantially contributed to the conception of this work, drafted and revised the manuscript, before finally approving its submission. CS, PH, GP, DB, DC, BL-M, FD and OT agreed to be accountable for all aspects of the work.

References

[1] B. Heissig, Y. Salama, S. Takahashi, T. Osada, K. Hattori, The multifaceted role of plasminogen in inflammation, Cell. Signal. 75 (2020) 109761, https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109761.

[2] S.K. Baker, S. Strickland, A critical role for plasminogen in inflammation, J. Exp. Med. 217 (2020), e20191865, https://doi.org/10.1084/jem.20191865.

[3] L. Lin, K. Hu, Tissue plasminogen activator and inflammation: from phenotype to signaling mechanisms, Am J Clin Exp Immunol. 3 (2014) 30–36.

[4] A. Mehra, C. Ali, J. Parcq, D. Vivien, F. Docagne, The plasminogen activation system in neuroinflammation, BBA 1862 (3) (2016) 395–402, https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.011.

[5] C. Zhang, J. An, D.K. Strickland, M. Yepes, The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain, Am. J. Pathol. 174 (2) (2009) 586–594, https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080661.

[6] B. Uhl, G. Zuchtriegel, D. Puhr-Westerheide, M. Praetner, M. Rehberg, M. Fabritius, M. Hessenauer, M. Holzer, A. Khandoga, R. Fürst, S. Zahler, F. Krombach, C. A. Reichel, Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 34 (7) (2014) 1495–1504, https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303721.

[7] L. Lin, C. Wu, K. Hu, Tissue plasminogen activator activates NF-κB through a pathway involving annexin A2/CD11b and integrin-linked kinase, J. Am. Soc. Nephrol. 23 (8) (2012) 1329–1338, https://doi.org/10.1681/ASN.2011111123.

[8] T. Mizrachi, D. Gur-Wahnon, A. Al-Roof Higazi, T. Brenner, Role of tissue plasminogen activator in clinical aggravation of experimental autoimmune encephalomyelitis and its therapeutic potential, Cell. Immunol. 348 (2020) 104040, https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104040.

[9] P. Hélie, C. Camacho-Toledano, L. Lesec, C. Seillier, A.J. Miralles, M.C. Ortega, S. Guérit, H. Lebas, I. Bardou, V. Vila-Del Sol, D. Vivien, B. Le Mauff, D. Clemente, F. Docagne, O. Toutirais, Tissue plasminogen activator worsens experimental autoimmune encephalomyelitis by complementary actions on lymphoid and myeloid cell responses, J. Neuroinflamm. 18 (2021) 52, https://doi.org/10.1186/s12974-021-02102-5.

[10] D. Gur-Wahnon, T. Mizrachi, S. Wald-Altman, A. Al-Roof Higazi, T. Brenner, Tissue plasminogen activator involvement in experimental autoimmune myasthenia gravis: aggravation and therapeutic potential, J. Autoimmun. 52 (2014) 36–43, https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.017.

[11] E.G. Levin, G.J. del Zoppo, Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels, Am. J. Pathol. 144 (1994) 855–861.

[12] M. Louessard, A. Lacroix, M. Martineau, G. Mondielli, A. Montagne, F. Lesept, B. Lambolez, B. Cauli, J.-P. Mothet, D. Vivien, E. Maubert, Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons, Mol. Neurobiol. 53 (7) (2016) 5000–5012, https://doi.org/10.1007/s12035-015-9432-7.

[13] T.K. Stevenson, D.A. Lawrence, Characterization of Tissue Plasminogen Activator Expression and Trafficking in the Adult Murine Brain, eNeuro 5 (2018), https://doi.org/10.1523/ENEURO.0119-18.2018.

[14] Z. Zheng, L. Nayak, W. Wang, A. Yurdagul, X. Wang, B. Cai, S. Lapping, L. Ozcan, R. Ramakrishnan, R.G. Pestell, M.K. Jain, I. Tabas, An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1, Blood 133 (2019) 743–753, https://doi.org/10.1182/blood-2018-07-864843.

[15] F. Wiesbauer, C. Kaun, G. Zorn, G. Maurer, K. Huber, J. Wojta, HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins, Br. J. Pharmacol. 135 (2002) 284–292, https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704454.

[16] H.M. Wilson, N.E. Haites, F.J. Reid, N.A. Booth, Interleukin-1 beta up-regulates the plasminogen activator/plasmin system in human mesangial cells, Kidney Int. 49 (1996) 1097–1104, https://doi.org/10.1038/ki.1996.159.

[17] P.H. Hart, D.R. Burgess, G.F. Vitti, J.A. Hamilton, Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator, Blood 74 (1989) 1222–1225.

[18] C. Sillaber, M. Baghestanian, D. Bevec, M. Willheim, H. Agis, S. Kapiotis, W. Füreder, H.C. Bankl, H.P. Kiener, W. Speiser, B.R. Binder, K. Lechner, P. Valent, The mast cell as site of tissue-type plasminogen activator expression and fibrinolysis, J. Immunol. 162 (1999) 1032–1041.

[19] E.J. Loef, A.E.S. Brooks, N. Lorenz, N.P. Birch, P.R. Dunbar, Neuroserpin regulates human T cell-T cell interactions and proliferation through inhibition of tissue plasminogen activator, J. Leukoc. Biol. 107 (1) (2020) 145–158, https://doi.org/10.1002/jlb.v107.110.1002/JLB.2A1019-098RR.

[20] D. Pennica, W.E. Holmes, W.J. Kohr, R.N. Harkins, G.A. Vehar, C.A. Ward, W. F. Bennett, E. Yelverton, P.H. Seeburg, H.L. Heyneker, D.V. Goeddel, D. Collen, Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli, Nature 301 (5897) (1983) 214–221, https://doi.org/10.1038/301214a0.

[21] Y. Suzuki, N. Nagai, K. Yamakawa, J. Kawakami, H.R. Lijnen, K. Umemura, Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein, Blood 114 (2009) 3352–3358, https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-203919.

[22] X. Wang, S.-R. Lee, K. Arai, S.-R. Lee, K. Tsuji, G.W. Rebeck, E.H. Lo, Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator, Nat. Med. 9 (10) (2003) 1313–1317, https://doi.org/10.1038/nm926.

[23] M. Hoylaerts, D.C. Rijken, H.R. Lijnen, D. Collen, Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator, Role of fibrin, J Biol Chem. 257 (6) (1982) 2912–2919.

[24] H. Kagitani, M. Tagawa, K. Hatanaka, T. Ikari, A. Saito, H. Bando, K. Okada, O. Matsuo, Expression in E. coli of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity, FEBS Lett. 189 (1985) 145–149, https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80860-7.

[25] F. Casse, I. Bardou, L. Danglot, A. Briens, A. Montagne, J. Parcq, A. Alahari, T. Galli, D. Vivien, F. Docagne, Glutamate controls tPA recycling by astrocytes,

which in turn influences glutamatergic signals, J. Neurosci. 32 (15) (2012) 5186–5199, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5296-11.2012.
[26] D. Vivien, M. Gauberti, A. Montagne, G. Defer, E. Touzé, Impact of tissue plasminogen activator on the neurovascular unit: from clinical data to experimental evidence, J. Cereb. Blood Flow Metab. 31 (11) (2011) 2119–2134, https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.127.
[27] C.-J. Siao, S.R. Fernandez, S.E. Tsirka, Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury, J. Neurosci. 23 (8) (2003) 3234–3242.
[28] M. Sharma, R.T. Ownbey, M.C. Sharma, Breast cancer cell surface annexin II induces cell migration and neoangiogenesis via tPA dependent plasmin generation, Exp. Mol. Pathol. 88 (2) (2010) 278–286, https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.01.001.
[29] T. Bertrand, F. Lesept, A. Chevilley, S. Lenoir, M. Aimable, A. Briens, Y. Hommet, I. Bardou, J. Parcq, D. Vivien, Conformations of tissue plasminogen activator (tPA) orchestrate neuronal survival by a crosstalk between EGFR and NMDAR, Cell Death Dis. 6 (10) (2015) e1924, https://doi.org/10.1038/cddis.2015.296.
[30] F. Correa, M. Gauberti, J. Parcq, R. Macrez, Y. Hommet, P. Obiang, M. Hernangómez, A. Montagne, G. Liot, C. Guaza, E. Maubert, C. Ali, D. Vivien, F. Docagne, Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke, J. Exp. Med. 208 (2011) 1229–1242, https://doi.org/10.1084/jem.20101880.
[31] G. Liot, B.D. Roussel, N. Lebeurrier, K. Benchenane, J.P. Lopez-Atalaya, D. Vivien, C. Ali, Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity, J. Neurochem. 98 (5) (2006) 1458–1464, https://doi.org/10.1111/jnc.2006.98.issue-510.1111/j.1471-4159.2006.03982.x.
[32] J. Kuiper, A. Van't Hof, M. Otter, E.A. Biessen, D.C. Rijken, T.J. van Berkel, Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions, Biochem. J. 313 (Pt 3) (1996) 775–780, https://doi.org/10.1042/bj3130775.
[33] K.S. Kim, Y.-K. Hong, Y. Lee, J.-Y. Shin, S.-I. Chang, S.I. Chung, Y.A. Joe, Differential inhibition of endothelial cell proliferation and migration by urokinase subdomains: amino-terminal fragment and kringle domain, Exp. Mol. Med. 35 (6) (2003) 578–585, https://doi.org/10.1038/emm.2003.76.
[34] L. Fredriksson, H. Li, C. Fieber, X. Li, U. Eriksson, Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC, EMBO J. 23 (19) (2004) 3793–3802, https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600397.
[35] J.P. Lopez-Atalaya, B.D. Roussel, D. Levrat, J. Parcq, O. Nicole, Y. Hommet, K. Benchenane, H. Castel, J. Leprince, D. To Van, R. Bureau, S. Rault, H. Vaudry, K.-U. Petersen, J.-D. Santos, C. Ali, D. Vivien, Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity, J. Cereb. Blood Flow Metab. 28 (6) (2008) 1212–1221, https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.14.
[36] O. Nicole, F. Docagne, C. Ali, I. Margaill, P. Carmeliet, E.T. MacKenzie, D. Vivien, A. Buisson, The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling, Nat. Med. 7 (1) (2001) 59–64, https://doi.org/10.1038/83358.
[37] J. Parcq, T. Bertrand, A.F. Baron, Y. Hommet, E. Anglès-Cano, D. Vivien, Molecular requirements for safer generation of thrombolytics by bioengineering the tissue-type plasminogen activator A chain, J. Thromb. Haemost. 11 (2013) 539–546, https://doi.org/10.1111/jth.12128.
[38] S. Handt, W.G. Jerome, L. Tietze, R.R. Hantgan, Plasminogen activator inhibitor-1 secretion of endothelial cells increases fibrinolytic resistance of an in vitro fibrin clot: evidence for a key role of endothelial cells in thrombolytic resistance, Blood 87 (1996) 4204–4213.
[39] S. Jang, T.H. Yang, E.J. An, H.K. Yoon, K.-C. Sohn, A.Y. Cho, E.-K. Ryu, Y.-S. Park, T.Y. Yoon, J.-H. Lee, C.D. Kim, Role of plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) in keratinocyte differentiation, J. Dermatol. Sci. 59 (1) (2010) 25–30, https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.04.012.
[40] E. Miranda, D.A. Lomas, Neuroserpin: a serpin to think about, Cell. Mol. Life Sci. 63 (6) (2006) 709–722, https://doi.org/10.1007/s00018-005-5077-4.
[41] H. Ritchie, A. Jamieson, N.A. Booth, Regulation, location and activity of plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) in peripheral blood monocytes, macrophages and foam cells, Thromb. Haemost. 77 (06) (1997) 1168–1173.
[42] S. Kennedy, A. van Diepen, C. van den Hurk, L. Coates, T. Woo Lee, L. Ostrovsky, E. Miranda, J. Perez, M. Davies, D. Lomas, R. Dunbar, N. Birch, Expression of the serine protease inhibitor neuroserpin in cells of the human myeloid lineage, Thromb. Haemost. 97 (03) (2007) 394–399.
[43] S. Mansilla, Y. Boulaftali, L. Venisse, V. Arocas, O. Meilhac, J.-B. Michel, M. Jandrot-Perrus, M.-C. Bouton, Macrophages and platelets are the major source of protease nexin-1 in human atherosclerotic plaque, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28 (10) (2008) 1844–1850, https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.171389.
[44] S.K. Bromley, S.Y. Thomas, A.D. Luster, Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics, Nat. Immunol. 6 (9) (2005) 895–901, https://doi.org/10.1038/ni1240.
[45] N. Sánchez-Sánchez, L. Riol-Blanco, J.L. Rodríguez-Fernández, The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells, J. Immunol. 176 (9) (2006) 5153–5159, https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5153.
[46] N. Lorenz, E.J. Loef, I.D. Kelch, D.J. Verdon, M.M. Black, M.J. Middleditch, D. R. Greenwood, E.S. Graham, A.ES. Brooks, P.R. Dunbar, N.P. Birch, Plasmin and regulators of plasmin activity control the migratory capacity and adhesion of human T cells and dendritic cells by regulating cleavage of the chemokine CCL21, Immunol. Cell Biol. 94 (10) (2016) 955–963, https://doi.org/10.1038/icb.2016.56.
[47] R.S. Friedman, J. Jacobelli, M.F. Krummel, Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation, Nat. Immunol. 7 (10) (2006) 1101–1108, https://doi.org/10.1038/ni1384.
[48] Q. Li, Y. Laumonnier, T. Syrovets, T. Simmet, Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL20 secreted from plasmin-stimulated macrophages, Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai) 45 (2013) 593–600, https://doi.org/10.1093/abbs/gmt049.
[49] X. Li, T. Syrovets, F. Genze, K. Pitterle, A. Oberhuber, K.-H. Orend, T. Simmet, Plasmin triggers chemotaxis of monocyte-derived dendritic cells through an Akt2-dependent pathway and promotes a T-helper type-1 response, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 30 (3) (2010) 582–590, https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.202044.
[50] C. Cao, D.A. Lawrence, Y. Li, C.A.F. Von Arnim, J. Herz, E.J. Su, A. Makarova, B. T. Hyman, D.K. Strickland, L.i. Zhang, Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration, EMBO J. 25 (9) (2006) 1860–1870, https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601082.
[51] J. Wang, X. Zhang, L. Mu, M. Zhang, Z. Gao, J. Zhang, X. Yao, C. Liu, G. Wang, D. Wang, Q. Kong, Y. Liu, N.a. Li, B.o. Sun, H. Li, t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis, Clin Immunol. 152 (1-2) (2014) 90–100, https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.03.004.
[52] A. Reijerkerk, G. Kooij, S.M.A. van der Pol, T. Leyen, B. van het Hof, P.-O. Couraud, D. Vivien, C.D. Dijkstra, H.E. de Vries, Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier, J. Immunol. 181 (5) (2008) 3567–3574, https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3567.
[53] A. Reijerkerk, G. Kooij, S.M.A. van der Pol, T. Leyen, K. Lakeman, B. van Het Hof, D. Vivien, H.E. de Vries, The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier, J. Neurochem. 113 (2010) 447–453, https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06598.x.
[54] R. Macrez, M.C. Ortega, I. Bardou, A. Mehra, A. Fournier, S.M.A. Van der Pol, B. Haelewyn, E. Maubert, F. Lesept, A. Chevilley, F. de Castro, H.E. De Vries, D. Vivien, D. Clemente, F. Docagne, Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis, Brain 139 (9) (2016) 2406–2419, https://doi.org/10.1093/brain/aww172.
[55] A. Mehra, S. Guérit, R. Macrez, F. Gosselet, E. Sevin, H. Lebas, E. Maubert, H.E. De Vries, I. Bardou, D. Vivien, F. Docagne, Nonionotropic Action of Endothelial NMDA Receptors on Blood-Brain Barrier Permeability via Rho/ROCK-Mediated Phosphorylation of Myosin, J. Neurosci. 40 (8) (2020) 1778–1787, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0969-19.2019.
[56] L.CM. Dahl, Z. Nasa, JieYu Chung, B. Niego, V. Tarlac, H. Ho, A. Galle, S. Petratos, J.Y. Lee, F. Alderuccio, R.L. Medcalf, G. Mengod, The Influence of Differentially Expressed Tissue-Type Plasminogen Activator in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Implications for Multiple Sclerosis, PLoS One 11 (7) (2016) e0158653, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158653.
[57] W. Lu, M. Bhasin, S.E. Tsirka, Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis, J. Neurosci. 22 (24) (2002) 10781–10789.
[58] T. Teesalu, A.E. Hinkkanen, A. Vaheri, Coordinated induction of extracellular proteolysis systems during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice, Am. J. Pathol. 159 (6) (2001) 2227–2237, https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63073-8.
[59] E. East, D. Baker, G. Pryce, H.R. Lijnen, M.L. Cuzner, D. Gverić, A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis, Am. J. Pathol. 167 (2) (2005) 545–554, https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62996-3.
[60] H.L. Benson, S. Mobashery, M. Chang, F. Kheradmand, J.S. Hong, G.N. Smith, R. A. Shilling, D.S. Wilkes, Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4+ and CD8+ T cells, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 44 (5) (2011) 700–708, https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0125OC.
[61] R. Renckens, J.M. Pater, T. van der Poll, Plasminogen activator inhibitor type-1-deficient mice have an enhanced IFN-gamma response to lipopolysaccharide and staphylococcal enterotoxin B, J. Immunol. 177 (2006) 8171–8176, https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.8171.
[62] T. Bedke, F. Muscate, S. Soukou, N. Gagliani, S. Huber, Title: IL-10-producing T cells and their dual functions, Semin. Immunol. 44 (2019) 101335, https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101335.
[63] N. Lorenz, E.J. Loef, D.J. Verdon, C.-J. Chen, C.J. Mansell, C.E. Angel, A.E. S. Brooks, P.R. Dunbar, N.P. Birch, Human T cell activation induces synaptic translocation and alters expression of the serine protease inhibitor neuroserpin and its target protease, J. Leukoc. Biol. 97 (4) (2015) 699–710, https://doi.org/10.1189/jlb.1A0814-392R.
[64] M.F. Krummel, J.N. Mahale, L.F.K. Uhl, E.A. Hardison, A.M. Mujal, J.M. Mazet, R. J. Weber, Z.J. Gartner, A. Gérard, Paracrine costimulation of IFN-γ signaling by integrins modulates CD8 T cell differentiation, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 115 (45) (2018) 11585–11590, https://doi.org/10.1073/pnas.1804556115.
[65] N.A. Zumwalde, E. Domae, M.F. Mescher, Y. Shimizu, ICAM-1-dependent homotypic aggregates regulate CD8 T cell effector function and differentiation during T cell activation, J. Immunol. 191 (7) (2013) 3681–3693, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201954.
[66] R.J. Borg, A.L. Samson, A.-L. Au, A. Scholzen, M. Fuchsberger, Y.Y. Kong, R. Freeman, N.A. Mifsud, M. Plebanski, R.L. Medcalf, S.L. Nishimura, Dendritic Cell-Mediated Phagocytosis but Not Immune Activation Is Enhanced by Plasmin, PLoS One 10 (7) (2015) e0131216, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131216.

[67] E.K.O. Kruithof, S. Dunoyer-Geindre, Human tissue-type plasminogen activator, Thromb. Haemost. 112 (08) (2014) 243–254, https://doi.org/10.1160/TH13-06-0517.
[68] F.O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, F1000Prime Rep. 6 (2014) 13, doi: 10.12703/P6-13.
[69] C.A. Roberts, A.K. Dickinson, L.S. Taams, The Interplay Between Monocytes/Macrophages and CD4(+) T Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis, Front. Immunol. 6 (2015) 571, https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00571.
[70] Y. Tatano, T. Shimizu, H. Tomioka, Unique macrophages different from M1/M2 macrophages inhibit T cell mitogenesis while upregulating Th17 polarization, Sci. Rep. 4 (2014) 4146, https://doi.org/10.1038/srep04146.
[71] L. Lin, K. Hu, Tissue-type plasminogen activator modulates macrophage M2 to M1 phenotypic change through annexin A2-mediated NF-κB pathway, Oncotarget. 8 (2017) 88094–88103, https://doi.org/10.18632/oncotarget.21510.
[72] L. Lin, Y. Jin, K. Hu, Tissue-type plasminogen activator (tPA) promotes M1 macrophage survival through p90 ribosomal S6 kinase (RSK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, J. Biol. Chem. 290 (12) (2015) 7910–7917, https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599688.
[73] M.A. Sugimoto, A.L.C. Ribeiro, B.R.C. Costa, J.P. Vago, K.M. Lima, F.S. Carneiro, M.M.O. Ortiz, G.L.N. Lima, A.A.F. Carmo, R.M. Rocha, D.A. Perez, A.C. Reis, V. Pinho, L.A. Miles, C.C. Garcia, M.M. Teixeira, L.P. Sousa, Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1, Blood 129 (2017) 2896–2907, https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-742825.
[74] E. Mantuano, C. Brifault, M.S. Lam, P. Azmoon, A.S. Gilder, S.L. Gonias, LDL receptor-related protein-1 regulates NFκB and microRNA-155 in macrophages to control the inflammatory response, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 113 (5) (2016) 1369–1374, https://doi.org/10.1073/pnas.1515480113.
[75] E. Mantuano, P. Azmoon, C. Brifault, M.A. Banki, A.S. Gilder, W.M. Campana, S. L. Gonias, Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity, Blood 130 (2017) 1364–1374, https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-780205.
[76] L. Das, P. Azmoon, M.A. Banki, E. Mantuano, S.L. Gonias, S. Furuta, Tissue-type plasminogen activator selectively inhibits multiple toll-like receptors in CSF-1-differentiated macrophages, PLoS ONE 14 (11) (2019) e0224738, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224738.
[77] L. Burysek, T. Syrovets, T. Simmet, The serine protease plasmin triggers expression of MCP-1 and CD40 in human primary monocytes via activation of p38 MAPK and janus kinase (JAK)/STAT signaling pathways, J. Biol. Chem. 277 (36) (2002) 33509–33517, https://doi.org/10.1074/jbc.M201941200.
[78] T. Syrovets, M. Jendrach, A. Rohwedder, A. Schüle, T. Simmet, Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation, Blood 97 (2001) 3941–3950, https://doi.org/10.1182/blood.v97.12.3941.
[79] J.R. Ward, S.K. Dower, M.K.B. Whyte, D.J. Buttle, I. Sabroe, Potentiation of TLR4 signalling by plasmin activity, Biochem. Biophys. Res. Commun. 341 (2) (2006) 299–303, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.188.
[80] H. Shimazu, S. Munakata, Y. Tashiro, Y. Salama, D. Dhahri, S. Eiamboonsert, Y. Ota, H. Onoda, Y. Tsuda, Y. Okada, H. Nakauchi, B. Heissig, K. Hattori, Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality in a murine model of macrophage activation syndrome, Blood 130 (2017) 59–72, https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-738096.
[81] N.M. Andronicos, E.I. Chen, N. Baik, H. Bai, C.M. Parmer, W.B. Kiosses, M. P. Kamps, J.R. Yates, R.J. Parmer, L.A. Miles, Proteomics-based discovery of a novel, structurally unique, and developmentally regulated plasminogen receptor, Plg-RKT, a major regulator of cell surface plasminogen activation, Blood 115 (2010) 1319–1330, https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-188938.
[82] L.A. Miles, L. Ny, M. Wilczynska, Y. Shen, T. Ny, R.J. Parmer, Plasminogen Receptors and Fibrinolysis, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 1712, https://doi.org/10.3390/ijms22041712.
[83] C. Zalfa, P. Azmoon, E. Mantuano, S.L. Gonias, Tissue-type plasminogen activator neutralizes LPS but not protease-activated receptor-mediated inflammatory responses to plasmin, J. Leukoc. Biol. 105 (4) (2019) 729–740, https://doi.org/10.1002/JLB.3A0818-329RRR.
[84] M. Menges, S. Rössner, C. Voigtländer, H. Schindler, N.A. Kukutsch, C. Bogdan, K. Erb, G. Schuler, M.B. Lutz, Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity, J. Exp. Med. 195 (2002) 15–21, https://doi.org/10.1084/jem.20011341.
[85] M. Locati, G. Curtale, A. Mantovani, Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity, Annu. Rev. Pathol. 15 (1) (2020) 123–147, https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Hypothèses et objectifs

L'inflammation est un processus physiologique très complexe de défense contre les agressions de l'organisme (agents microbiens, traumatismes *etc.*). Elle se caractérise par le recrutement de cellules immunitaires, telles que les neutrophiles ou les monocytes/macrophages au site de la lésion. Ces cellules activées par des signaux de danger produisent des médiateurs de l'inflammation (cytokines, prostaglandines, protéases *etc.*) et phagocytent les agents microbiens ainsi que les débris de cellules mortes.

De nombreux liens bidirectionnels existent entre l'immunité et l'hémostase. La coagulation par exemple, au travers de la thrombine, est capable de favoriser la vasodilatation, la perméabilité membranaire et l'adhérence des leucocytes à l'endothélium (Touyz, 2007; Cleator and Vaughan, 2008; Claesson-Welsh, 2015). À l'inverse, les leucocytes circulants stimulés par des PAMPs présentent du FT à leur surface, qui active la voie extrinsèque de la coagulation (Carraway *et al.*, 2003; Levi and Van Der Poll, 2010). Une dérégulation et/ou une hyperactivation des interactions hémostase/immunité sont retrouvées dans de nombreuses maladies inflammatoires d'origine auto-immune ou infectieuse (Hu, Mars and Liu, 2008; Wang *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2016).

Le tPA est une sérine-protéase qui participe également à la régulation des interactions hémostase/immunité. Si son action fibrinolytique est bien décrite, son rôle exact dans l'inflammation et l'immunité reste encore incomplètement compris. Le tPA peut agir indirectement au travers de la conversion du plasminogène en plasmine, l'enzyme effectrice de la fibrinolyse. La plasmine a des fonctions pléiotropes dans le fonctionnement du système immunitaire (Draxler, Sashindranath and Medcalf, 2017). Elle est décrite majoritairement comme un facteur pro-inflammatoire, car elle est capable d'induire la production de cytokines par les macrophages. Le tPA agit également comme une cytokine en se fixant sur des récepteurs spécifiques. *In vitro*, il a été démontré que le tPA bloquait l'activation des macrophages induite par le LPS en interagissant avec le récepteur NMDA (Zalfa *et al.*, 2019).

In vivo, la fonction du tPA a été étudiée principalement dans les contextes d'infections, de neuroinflammation et des maladies inflammatoires rénales, en se basant majoritairement sur l'utilisation de souris déficientes pour le tPA, ou sur des souris transgéniques dans lesquelles le tPA est surexprimé.

À ce jour, pour comprendre la fonction exacte du tPA dans l'inflammation, des données demeurent manquantes quant à son rôle sur l'activation des phagocytes mononuclées (macrophages/DCs) *in vivo*. En utilisant un modèle d'inflammation basée sur l'injection de LPS dans des souris déficientes pour le tPA, nous avons cherché à déterminer si la sérine-protéase pouvait impacter le phénotype et la répartition des macrophages et des DCs

RÉSULTATS

Tissue-plasminogen activator alters the phenotype of splenic mononuclear phagocyte cells in acute inflammation

Seillier Célia[a], Lesec Léonie[a], Hélie Pauline[a,1], Vivien Denis[a, b], Docagne Fabian[a], Le Mauff Brigitte[a, c], Toutirais Olivier[a, c]

a Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, FRANCE.

b Department of clinical research, Caen University Hospital, CHU Caen, France.

c Department of Immunology and Histocompatibility (HLA), Caen University Hospital, CHU Caen, France.

*Corresponding author: Olivier TOUTIRAIS, PhD. Inserm U1237, PhIND, Institut BB@C, Centre Cyceron, BP5229, 14074 Caen Cedex, France. Tel: +33 231470265. Email: toutirais-o@chu-caen.fr.

1Present address: Theodor Kocher Institute, University of Bern, Freiestrasse 1, CH-3012, Bern, Switzerland

ABSTRACT

Tissue-plasminogen activator (tPA) is a serine protease well known for its fibrinolytic function. Recent studies indicate that tPA, could also modulate inflammation via plasmin generation and/or by receptor mediated signaling *in vitro*. However, the contribution of tPA in inflammatory processes *in vivo* has not been fully addressed. Using tPA-deficient mice, we have analyzed the effect of lipopolysaccharide (LPS) challenge on the phenotype of macrophages and dendritic cells (DCs) in spleen. Twenty-four hours after endotoxin injection, we found that tPA strengthened the macrophage phenotype shift toward a pro-inflammatory M1 phenotype. Unexpectedly, LPS induced a deep downregulation of major histocompatibity class (MHC) II molecule level on macrophages and on a conventional DC (cDC) subset but this effect is counterbalanced by tPA. The serine protease promoted the expression of the costimulatory CD86 on macrophages but did not influence the frequency of immunogenic MHCII^{+} CD80^{+}CD86^{+} macrophages that was enhanced by LPS. Expression level of the CD11b integrin, known as a tPA receptor, was upregulated on macrophages suggesting that tPA effects could be amplified during inflammation. Finally, we reported that the relative frequency of cDC1 and cDC2 that are professional antigen-presenting cells particularly important for eliciting T cell response was modified in mice lacking of tPA. Our finding indicate that the role of tPA takes part at the interface between inflammation and adaptive immunity by promoting M1 phenotype, MHC class II and CD86 expression and modulating the distribution of cDC1 and cDC2.

INTRODUCTION

Inflammation is a host protective mechanism against invading microbial pathogens and tissue damage. It is a highly complex biological process and failure of regulatory mechanisms is associated with many diseases such as inflammatory bowel diseases, psoriasis or atherosclerosis [1–4]

Macrophages and dendritic cells (DCs) belong to the mononuclear phagocyte system and are major actors of the inflammatory response. Through specific receptors, they are able to sense microbial components and molecules derived from tissue damage. Recognition of these danger signals leads to altered expression of major histocompatibility complex (MHC) and costimulatory molecules such as CD80 and CD86; and pro-inflammatory cytokines that are required to activate adaptive immune response. Macrophages are a heterogeneous population of immune cells and, schematically can polarize into two phenotypes: classical activated macrophages (M1) and alternatively activated macrophages (M2). M1 macrophages have a pro-inflammatory phenotype with pathogen-killing abilities and expressed the markers inducible nitric oxide synthase (iNOS) and CD38 while anti-inflammatory M2 macrophages promote cell proliferation and tissue repair; and are defined by the markers Arginase-1 and CD206 [5,6]

DCs are considered as the most efficient antigen presenting cells capable of efficiently taking up and presenting antigens to naïve T cells, thus initiating the adaptive immune response. DCs also play a crucial role in maintenance of immune tolerance to self-antigens. While the lineage of DCs is diverse, conventional DCs (cDCs) expressing CD11c are the dominant subset in the spleen [7]. Using the integrin adhesion molecule CD11b, cDCs can be divided into two subtypes: cDC1 are $MHCII^{+}/CD11b^{-}$ whereas cDC2 have a $MHCII^{+}/CD11b^{+}$ phenotype. Specific functions of each subset are not completely understood but some reports suggest that cDC1 are highly specialized in cross-presentation and activation of cytotoxic T cells, whereas cDC2 preferentially stimulate helper T responses [8,9].

In steady state, a pool of specialized DCs called “tolerogenic DCs” was found in the spleen of mice [10]. Tolerogenic DCs induce multiple mechanisms of immune tolerance including T cell anergy or generation of peripheral regulatory T cells [11]. Tolerogenic DCs display an immature phenotype with low expression of MHCII and costimulatory molecules (CD80, CD86) on their surface [12].

Important bidirectional interactions exist between hemostasis and inflammation, two biological systems that are phylogenetically linked as host defense mechanisms [13–15]. Plasminogen (PLG) activation system regulates the fibrinolysis and extracellular matrix degradation. tPA is a serine-protease that cleaves the zymogen PLG into plasmin, a key enzyme that degrades fibrin of bloodclot. Beside its critical function in the fibrinolytic system, many reports indicate that tPA has also a complex role in inflammation and innate immunity [16–18]. Contrasting effects of tPA are dependent from its proteolytic activity or are achieved by a “cytokine – like” mode through interactions with specific receptors [19]. *In vitro*, tPA stimulates pro-inflammatory pathways and cytokines in macrophages via the generation of plasmin [20–22]. On the other hand, tPA inhibits lipopolysaccharide-induced-macrophage activation by interacting with the N-methyl-D-aspartate Receptor (NMDA-R) [23]. In a murine E. coli peritonitis model, tPA which is up-regulated in the liver and in the lung during infection has a protective effect [24]. tPA has also deleterious effects in inflammation. Indeed, Guo et al showed that tPA-deficient mice had significantly higher rates of survival than WT mice in a model of sepsis induced by Staphylococcus aureus [25]. Paradoxically, Sugimoto *et al* showed that pleural injection of PLG and plasmin induced a switch of macrophage polarization toward a M2 phenotype suggesting that tPA may also contribute to the resolution of acute inflammation [26].

In the present study, the role of the serine protease in acute inflammation was investigated by injecting LPS in tPA deficient mice. By analysing the distribution of mononuclear phagocytes in the spleen, we showed that tPA favors LPS-induced M1 polarization but also hampered LPS inhibitor effect by increasing MHCII molecule expression on macrophages and cDC. While tPA does not modify the proportion of immunogenic macrophages expressing MHCII and

costimulatory molecules, it modifies the frequencies of cDC1 and cDC2 suggesting a contribution of the serine protease in the outcome of the adaptive response.

MATERIALS AND METHODS

Mice

tPA$^{-/-}$ (C57BL/6J background) and control C57BL/6J mice, aged 8-12 weeks, were provided by the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB, Normandy-University, France). tPA NULL mice were generated by an unique deletion of the exon-3 of the *Plat* gene, to avoid possible off target effect. Mice were housed in our local conventional animal facilities at 21°C in a 12 h light/dark cycle with food and water ad libitum. All procedures were performed according to the guidelines of the institutional ethics committee CENOMEXA (Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale). This was submitted to this committee for approval in accordance with the European directive n° 2013/63/UE (agreement number D14118001) and with the French and Regional Guidelines for Animal Experimentation and the Use of Genetically Modified Organisms (French Ministry of Research, project license #29143).

LPS Challenge

tPA$^{-/-}$ mice were injected intrainjected intra peritonealy with 1 mg/kg LPS (Sigma-Aldrich). Control mice received an equivalent volume of normal saline. 24h later, mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane (Aerrane, Baxter) and euthanized by cervical dislocation. The spleens were collected, as well as the blood by intracardiac puncture.

Isolation of leukocytes from spleen

After mechanical disruption of the spleen, cell suspension was filtered through a 40 µm filter (Beckton Dickinson) and erythrocytes were lysed with hypotonic buffer [0.8% NH_4Cl, 0.1 mM EDTA, $KHCO_3$EDTA, $KHCO_3$, pH 7.4 (Stemcell Technologies)]. Splenocytes were resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10%

heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Stemcell Technologies), 2.5% (v/v) hepes (Fisher) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco).

Flow cytometry

Splenocytes were resuspended in 50 µl of staining buffer and Fc receptors were blocked with 10 µg/mL anti-CD16/CD32 antibodies (BD Biosciences) for 15 min at 4°C. Cells were then labelled for cell surface markers with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (Table 1) 10 min in the dark at 4 °C and 7AAD (BioLegend) was added 15 min before analysis by flow cytometry. For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized using “Inside stain” kit according to manufacturer’s protocol (Miltenyi Biotec) before labelling with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (Table 1). Samples were acquired on a FACSVerse (Beckton Dickinson) and data analyzed with the FlowJo 7.6.5 software (TreeStar Inc.).

Statistical analysis

Results are shown as the median ± SD. Statistical analyses were performed using the Graphpad Prism 9.0 software. P values were calculated by one-way ANOVA for nonparametric data (Kruskal-Wallis test) with Dunn’s post-hoc test (multiple comparisons). $P<0.05$ is considered statistically significant. The ROUT method was used to determine presence of outliers (Q=1%).

RESULTS

Phenotype of splenic macrophages after LPS challenge

Several reports showed that tPA is involved in the regulation of macrophage and DC activation *in vitro* [20–22,27]. However, the role of tPA in inflammation has been poorly investigated *in vivo*. In this study, LPS challenge for 24h did not modify the absolute number and the frequency of macrophages (defined as F4/80$^+$ CD11b$^+$ cells) in spleen from WT or tPA-deficient mice (Fig 1A-C). By analyzing macrophage activation markers, we observed that most of macrophages did not express MHCII molecules in sham condition whereas there was a trend for an increase of MHCII$^+$ macrophage frequency after LPS treatment. Nevertheless, the level of MHCII molecules was decreased in macrophages after LPS treatment, and significantly more in tPA-deficient mice (MFI Sham WT 5161 ± 851 *vs* LPS WT 3081 ± 970 and MFI Sham tPA$^{-/-}$ 816 ± 471 *vs* LPS tPA$^{-/-}$ 2368 ± 113, P=0,0025; Fig 1D).

The acute inflammation differently modulates the expression of the CD80 and CD86 costimulatory molecules on macrophages. Indeed, exposure to LPS significantly increased the percentage of CD80$^+$/CD86$^+$/MHCII$^+$ (Sham WT 11,8 ± 2,3 % *vs* LPS WT 24.48 ± 7.2% P=0,0353) but not CD80$^+$/CD86$^+$/MHCII$^-$ splenic macrophages from WT mice. The opposite effect was observed in tPA$^{-/-}$ mice (Fig 1C). Regarding the cellular level of costimulatory molecules after LPS challenge, CD80 was up-regulated in MHCII$^-$ macrophages in WT mice (MFI Sham WT 682 ± 66 *vs* LPS WT 881 ± 93, P=0,0253) while CD86 was down-regulated in MHCII$^+$ macrophages from tPA-deficient mice exposed to LPS (MFI LPS WT1150 ± 969.7 *vs* LPS tPA$^{-/-}$ 1013 ± 62, P=0,0353; Fig 1D).

After LPS injection, there was a trend for an increase of CD11b integrin expression in MHCII$^+$ macrophages from WT mice while in mice lacking of tPA, CD11b is significantly up-regulated in both MHCII$^-$ (MFI Sham tPA$^{-/-}$ 22452 ± 2091 *vs* LPS tPA$^{-/-}$ 34934 ± 5908, P=0, 0050) and MHCII$^+$ macrophages (MFI Sham tPA$^{-/-}$ 21159 ± 1586 *vs* LPS tPA$^{-/-}$ 49995 ± 4803, P=0, 0227) (Fig 1D).

Although CD11c is described as DC marker, many reports described expression of its integrin on lymphoid or non-lymphoid tissue macrophages [28,29]. CD11c^{+} macrophage frequency is not affected neither by LPS nor by the lack of tPA (Supplementary data 1). Their phenotype was comparable to total splenic macrophages except the percentage of CD80^{+}/CD86^{+}/MHCII^{+} cells which was after LPS injection, without effect of tPA deficiency.

tPA is involved in M1/M2 macrophage polarization

Since it was reported that tPA could influence M1/M2 macrophage polarization in chronic renal disease, we examined the impact of tPA deficiency in the differentiation state of splenic macrophages upon acute inflammation. LPS challenge induced an increase of M1 macrophages (iNOS^{+} CD38^{+}) from WT mice that is not observed in mice lacking of tPA (Fig 2A). Among these M1 macrophages, the frequency of MHCII^{+} macrophages and the MHCII level were significantly lower in tPA-deficient as compared to WT mice after LPS stimulation.

We did not notice any modification of M2 macrophage (CD206^{+} Arg1^{+}) frequency in inflammation condition with or without tPA (Fig 2B). However, expression level of CD206 is significantly reduced in tPA$^{-/-}$ but not WT mice after LPS treatment.

tPA modifies splenic cDC distribution following LPS challenge

A decrease of total DCs (F4/80^{-} CD11c^{+}) was observed in spleen from WT but not tPA$^{-/-}$ mice treated with LPS (Fig 3A and B). In LPS-challenged tPA$^{-/-}$ mice, the frequency of cDC1 (CD11b^{-} MHCII^{+}) was significantly decreased while the frequency of cDC2 (CD11b^{+} MHCII^{+}) was increased, as compared to the sham condition (Fig 3C and D). No modification of cDC frequency was observed in LPS-treated mice.

cDC1 expressed a higher level of MHCII molecules than cDC2 or macrophages. The level of MHCII molecules on cDC1-like was not modified by LPS in both strains while in cDC2, LPS reduced MHCII expression, significantly in mice lacking of tPA.

In steady state, the costimulatory molecules CD80 and 86 were weakly expressed in both cDC subsets. LPS treatment increased the frequency of $CD80^+$ $CD86^+$ cDCs at the same level as $MHCII^+$ macrophages (about 25% of $CD80^+$ $CD86^+$ cells after LPS injection). In addition, cDC1 from $tPA^{-/-}$ mice are more prone to an increase of $CD80^+$ $CD86^+$ cell frequency than cDC2-like.

We distinguished three tolerogenic DC subsets that were not quantitatively modified by LPS treatment in both WT and $tPA^{-/-}$ mice (Supplementary data 2). The $CD11b^+$ subset was the less abundant but displayed the higher proportion of $CD80^+CD86^+$ cells. When comparing the costimulatory molecule expression magnitude, we noted that $CD11b^-$ and CD11blow tolerogenic DCs expressed lower levels of CD80 molecules as compared to the $CD11b^+$ subset, even in inflammatory context (supplementary data 3. The $CD11b^-$ subset expressed the higher level of CD86 molecules after LPS stimulation). As observed in $MHCII^+$ macrophages, level of CD11b expression was increased in $CD11b^{low}$ but on $CD11b^+$ tolerogenic DCs upon inflammatory condition.

tPA modulates T cell activation after LPS treatment

Few data exist on the effects of LPS injection on splenic T cell activation. LPS increased significantly the frequency of $CD25^+$ and $CD69^+$ but not $CD44^+$ T cells among splenocytes in $tPA^{-/-}$ mice while only a trend for an increase is observed in WT splenocytes (Fig 4A-C).

DISCUSSION

Previous studies have shown that tPA is a modulator of inflammation that, for instance, regulates the biology of macrophages [23,30]. However, little information exists about the role of the serine protease in inflammatory processes *in vivo*. Although LPS has been widely used to stimulate macrophages *in vitro*, its impact *in vivo* on splenic mononuclear phagocyte phenotype has been poorly studied. In resting state, a small population of splenic macrophages expressing MHCII and costimulatory molecules harbor an « immunogenic » phenotype. In our experiments, *in vivo*, LPS treatment upregulated the frequency of MHCII^{+} macrophages but also dramatically decreased the MHCII molecule expression level. Although it has been reported that *in vitro* stimulation with LPS increased MHCII^{+} frequency and expression, it has also been described that LPS antagonizes the stimulating effect of IFN-γ or IL-4 on MHCII molecule expression *in vitro* [31–34]. The inhibitor pathway triggered by LPS is currently unknown but could involve autocrine or paracrine secretion of IL-10 by macrophages, a cytokine known to down-regulate MHCII expression [35]. It may also explain why LPS impedes T cell mediated response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [36]. Interestingly, the levels of MHCII molecules on the whole macrophages and the M1 subset but also on cDC2 were weaker in tPA-deficient mice exposed to LPS. This is in agreement with our previous study showing that exogenous tPA increased the level of MHCII molecules on splenic macrophages and DC in EAE mice [37].

Lin *et al* have shown that CD11b is a coreceptor of annexin A2 involved in the tPA intracellular signaling [38]. Importantly, we evidenced that LPS strongly increased the level of CD11b on MHCII^{+} macrophages and tolerogenic CD11b^{low} DCs but not on cDC suggesting that the Gram-endotoxin could selectively increase the sensitivity of these cell subsets to tPA. Of note, upregulation of CD11b by LPS is observed in MHCII^{-} macrophages from tPA$^{-/-}$ but not WT. It could be a negative feedback of tPA, on one of its receptors, regulating tPA activity in MHCII^{-} macrophages in inflammatory conditions.

Although the M1/M2 polarization paradigm mainly results from *in vitro* studies, our results showed that LPS injection induced an upregulation of M1 cells *in vivo* [39,40]. However, frequency of M1 cells is decreased in tPA$^{-/-}$ mice, in agreement with previous studies showing that tPA promotes M1 phenotype *in vitro* and in a model of chronic renal disease *in vivo* [41]. M1 cell reduction in tPA-deficient mice may explain by the pro-survival effect of the serine protease on M1 macrophages [42]. The role of tPA in regulation of macrophages activation is nevertheless more complex since, it also maintains the expression of the M2 marker CD206 after LPS stimulation without modifying the frequency of M2 cells. Sugimoto *et al* have shown that pleural injection of PLG and plasmin increased CD206 expression on macrophages suggesting that tPA may have a pleiotropic and dynamic role in the course of inflammation acting both in the beginning and in the resolving phases of inflammation [26].

Splenic CD11c^{+} macrophages are associated with inflammatory pathologies in organ such as lung and kidney [28,29]. In our study, this subset retains many phenotypic characteristics of MHCII^{+} macrophages but are more prone to express CD80 and CD86 costimulatory molecules. Drutman *et al* have shown that splenic CD11c^{+} macrophages also share close phenotypic and functional properties with activated macrophages (endocytosis and poor T cell stimulation ability) [43]. Our results also confirmed previous observation showing that LPS treatment decreases CD11c expression on myeloid cells [44]. It has been suggested that CD11c/CD18, acting as a LPS receptor, is downregulated following the binding with its ligand [45].

In our study, LPS treatment reduced the proportion of total DCs in spleen, likely by altering their migratory capacity and their dissemination in other organs, and no effect of tPA on the frequency of total cDC was noticed. These results are not in agreement with Draxler *et al* who have described that tPA induced a decrease of splenic cDC proportion 24h after its administration in mice [46]. By comparing deficient and WT mice, we did not notice an effect of tPA on the frequency of total cDC Nevertheless, we could show that tPA modulates the proportion of cDC1 et DC2 subsets. Hancock *et al* have shown that cDC1 and cDC2 isolated form LPS-treated mice have distinct transcriptomic signatures even though they share a set of

common genes induced by LPS [47]. Although the cDC subsets have redundant functions, cDC1 are specialized in CTL and Th1 responses while cDC2 are more prone to regulate T cell differentiation toward Th2 or Th17 profiles [48]. So, further investigations are required to know at which level tPA may impact the outcome of the T cell response *in vivo*.

In conclusion, our study updates the description of the effects of LPS on the mononuclear phagocyte phenotype *in vivo* and reports on its contrasted function in inflammation. On one hand, LPS increases the proportion of immunogenic macrophages expressing MHC class II and costimulatory molecules but on the other hand, it decreases the MHCII expression level and so, reduces potentially their ability to stimulate T cells in an efficient way. tPA appears as a modulator of the adaptive immune response by antagonizing LPS effect on MHCII expression, enhancing M1 profile and modifying the distribution of cDCs upon inflammation.

Figure 1

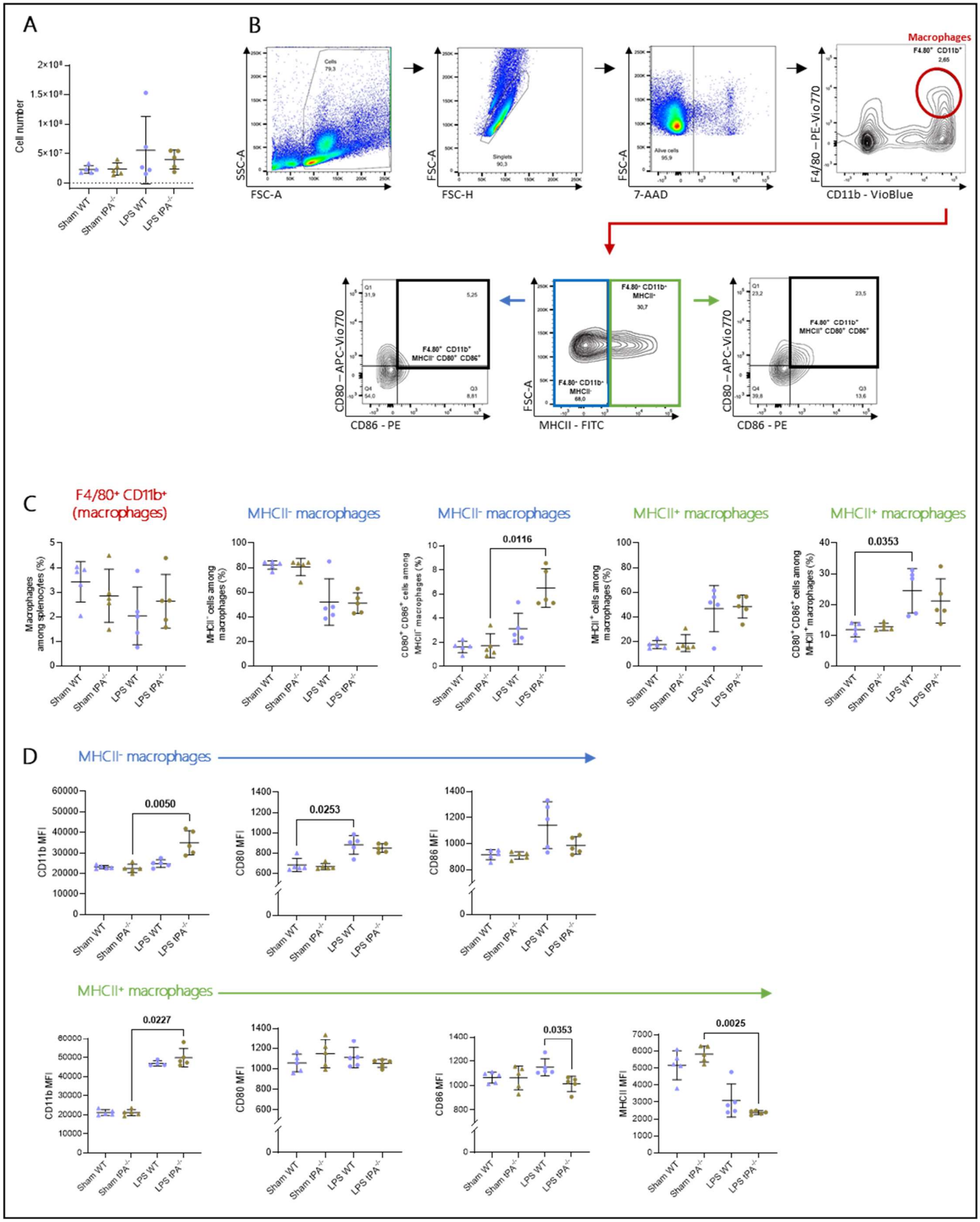

A
Cell number
Sham WT
Sham tPA-/-
LPS WT
LPS tPA-/-
B
Macrophages
SSC-A
FSC-A
FSC-H
7-AAD
F4/80 – PE-Vio770
CD11b - VioBlue
CD80 – APC-Vio770
CD86 - PE
MHCII - FITC
C
F4/80+ CD11b+ (macrophages)
MHCII- macrophages
MHCII+ macrophages
0.0116
0.0353
D
MHCII- macrophages
CD11b MFI
CD80 MFI
CD86 MFI
0.0050
0.0253
MHCII+ macrophages
MHCII MFI
0.0227
0.0353
0.0025

Figure 1: Effect of LPS treatment on the phenotype of splenic macrophages from tPA$^{-/-}$ mice. A) Quantification of total splenocytes by flow cytometry and cell counting. **B)** Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of macrophages (F4/80^{+} CD11b^{+}), expressing MHCII molecules (F4/80^{+} CD11b^{+} MHCII^{+}) or not (F4/80^{+} CD11b^{+} MHCII^{-}) and costimulatory molecules (F4/80^{+} CD11b^{+} MHCII$^{+/-}$ CD80^{+} CD86^{+}). **C)** Quantification of macrophage frequency, expressing MHCII molecules (F4/80^{+} CD11b^{+} MHCII^{+}) or not (F4/80^{+} CD11b^{+} MHCII^{-}) and costimulatory molecules (F4/80^{+} CD11b^{+} MHCII$^{+/-}$ CD80^{+} CD86^{+}). **D)** Quantification of MFI of CD11b, CD80, CD86 and MHCII molecules on MHCII$^{+/-}$ macrophages. Data are showed as individual animals with median ± SD, n=5, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

Figure 2

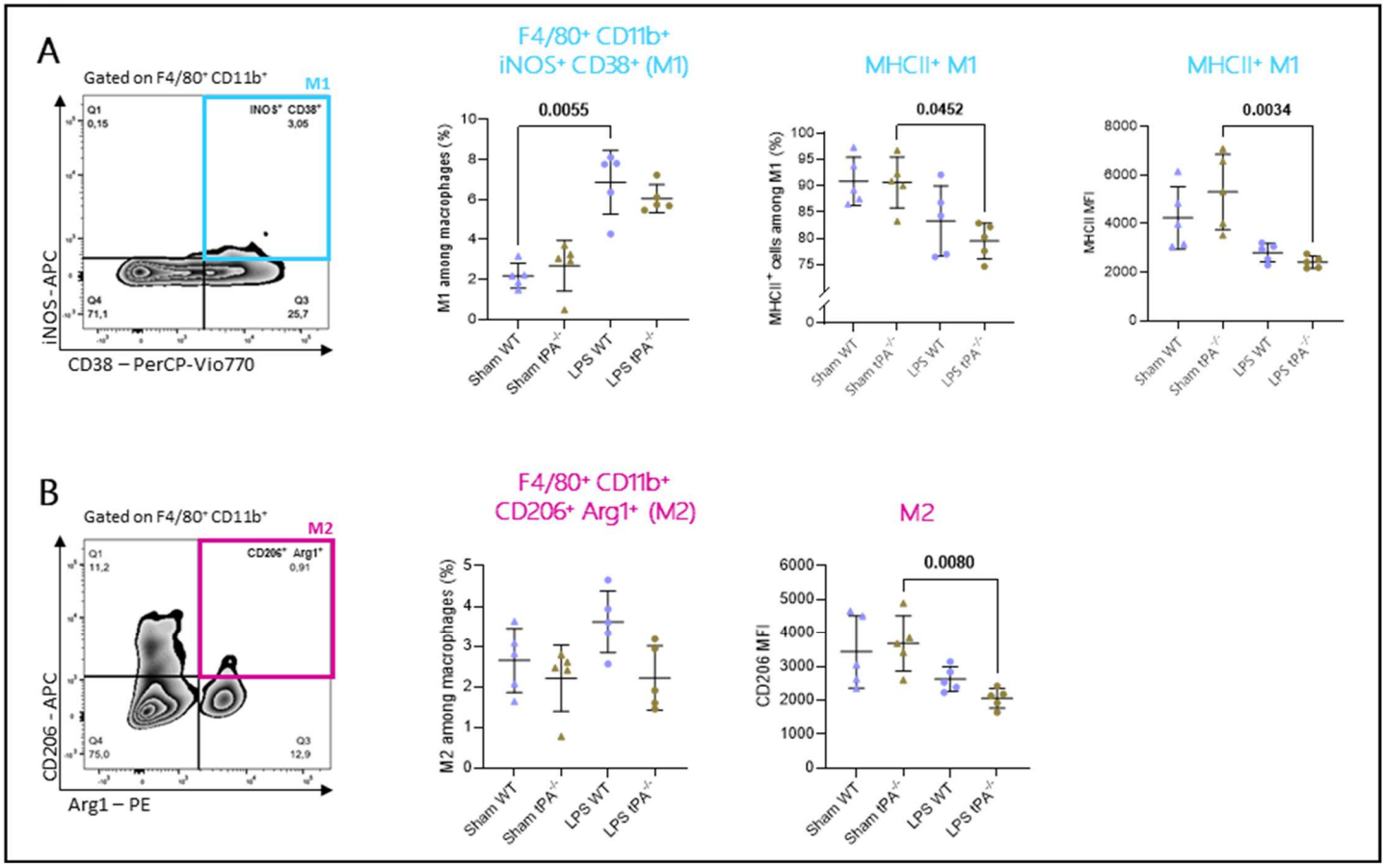

A
Gated on F4/80+ CD11b+
M1
Q1
0,15
iNOS+ CD38+
3,05
Q4
71,1
Q3
25,7
iNOS - APC
CD38 – PerCP-Vio770
F4/80+ CD11b+
iNOS+ CD38+ (M1)
0.0055
M1 among macrophages (%)
Sham WT
Sham tPA-/-
LPS WT
LPS tPA-/-
MHCII+ M1
0.0452
MHCII+ cells among M1 (%)
MHCII+ M1
0.0034
MHCII MFI
B
Gated on F4/80+ CD11b+
M2
Q1
11,2
CD206+ Arg1+
0,91
Q4
75,0
Q3
12,9
CD206 - APC
Arg1 – PE
F4/80+ CD11b+
CD206+ Arg1+ (M2)
M2 among macrophages (%)
M2
0.0080
CD206 MFI

Figure 2: tPA impacts M1/M2 polarization upon inflammatory stimulation. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of M1 (F4/80$^+$ CD11b$^+$ iNOS$^+$ CD38$^+$). Quantification of M1 ± MHCII cell frequency and MFI of MHCII$^+$ on M1 cells. **B)** Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of M2 (F4/80$^+$ CD11b$^+$ CD206$^+$ Arg-1$^+$). Quantification of M2 cell frequency and MFI of CD206$^+$ molecules on M2 cells. Data are showed as individual animals with median ± SD, n=5, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

Figure 3

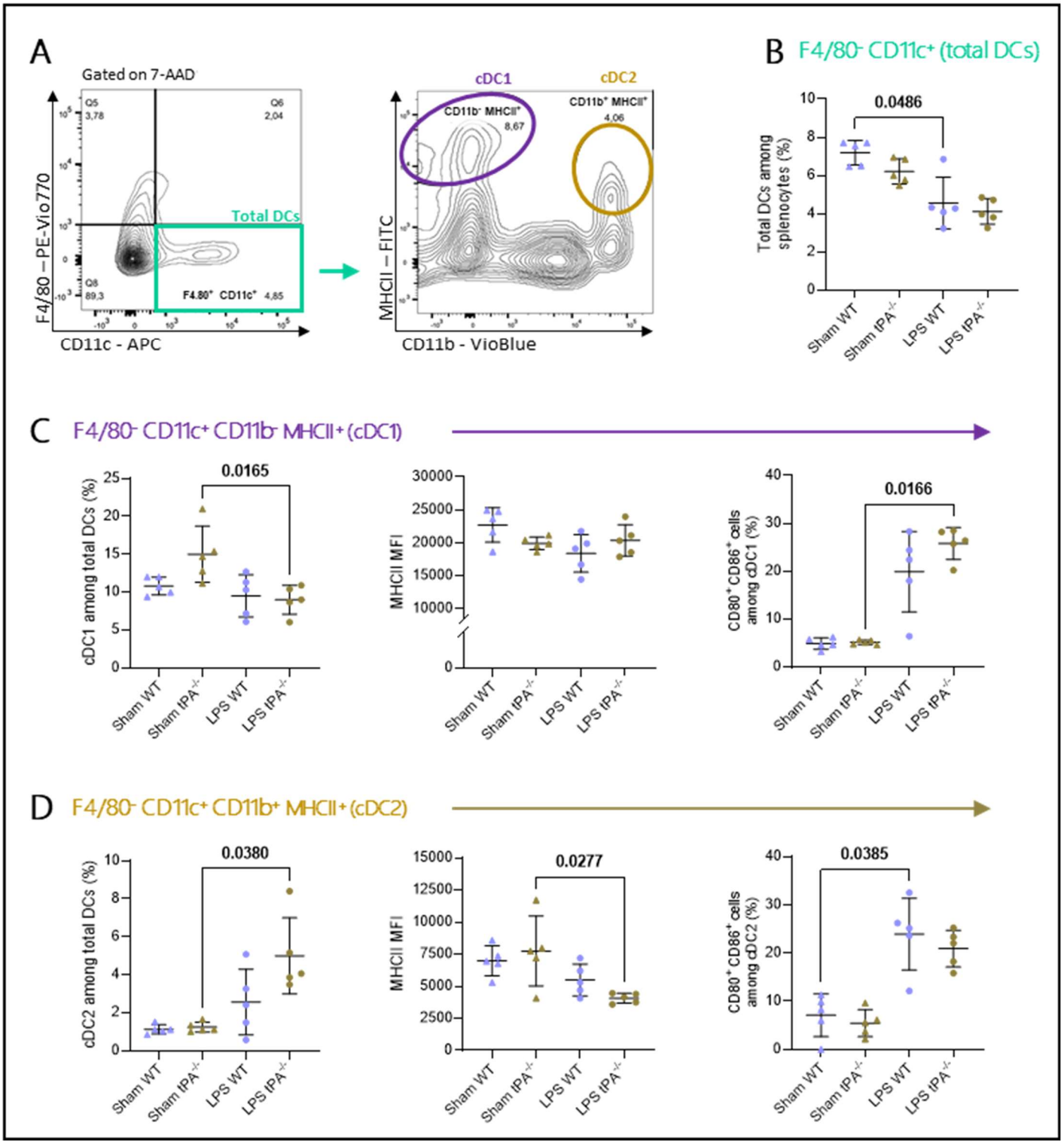

A
Gated on 7-AAD
Q5 3,78
Q6 2,04
Q8 89,3
Total DCs
F4.80+ CD11c+ 4,85
F4/80 – PE-Vio770
CD11c - APC
cDC1
cDC2
CD11b- MHCII+ 8,67
CD11b+ MHCII+ 4,06
MHCII – FITC
CD11b - VioBlue
B F4/80- CD11c+ (total DCs)
0.0486
Total DCs among splenocytes (%)
Sham WT
Sham tPA-/-
LPS WT
LPS tPA-/-
C F4/80- CD11c+ CD11b- MHCII+ (cDC1)
0.0165
cDC1 among total DCs (%)
MHCII MFI
0.0166
CD80+CD86+ cells among cDC1 (%)
D F4/80- CD11c+ CD11b+ MHCII+ (cDC2)
0.0380
cDC2 among total DCs (%)
0.0277
MHCII MFI
0.0385
CD80+CD86+ cells among cDC2 (%)

Figure 3: tPA affects cDCs repartition in inflammatory setting. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of total DCs (F4/80$^-$ CD11c$^+$) and cDCs: cDC1 (F4/80$^-$ CD11c$^+$ CD11b$^-$ MHCII$^+$), cDC2 (F4/80$^-$ CD11c$^+$ CD11b$^+$ MHCII$^+$). **B)** Quantification of total DC frequency. **C)** Quantification of cDC1 frequency, MFI of MHCII molecules on cDC1, and CD80$^+$ CD86$^+$ cell frequency among cDC1. **D)** Quantification of cDC2 frequency, MFI of MHCII on cDC1, and CD80$^+$ CD86$^+$ cell frequency among cDC1. Data are showed as individual animals with median ± SD, n=5, * $p<0.05$ by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

Figure 4

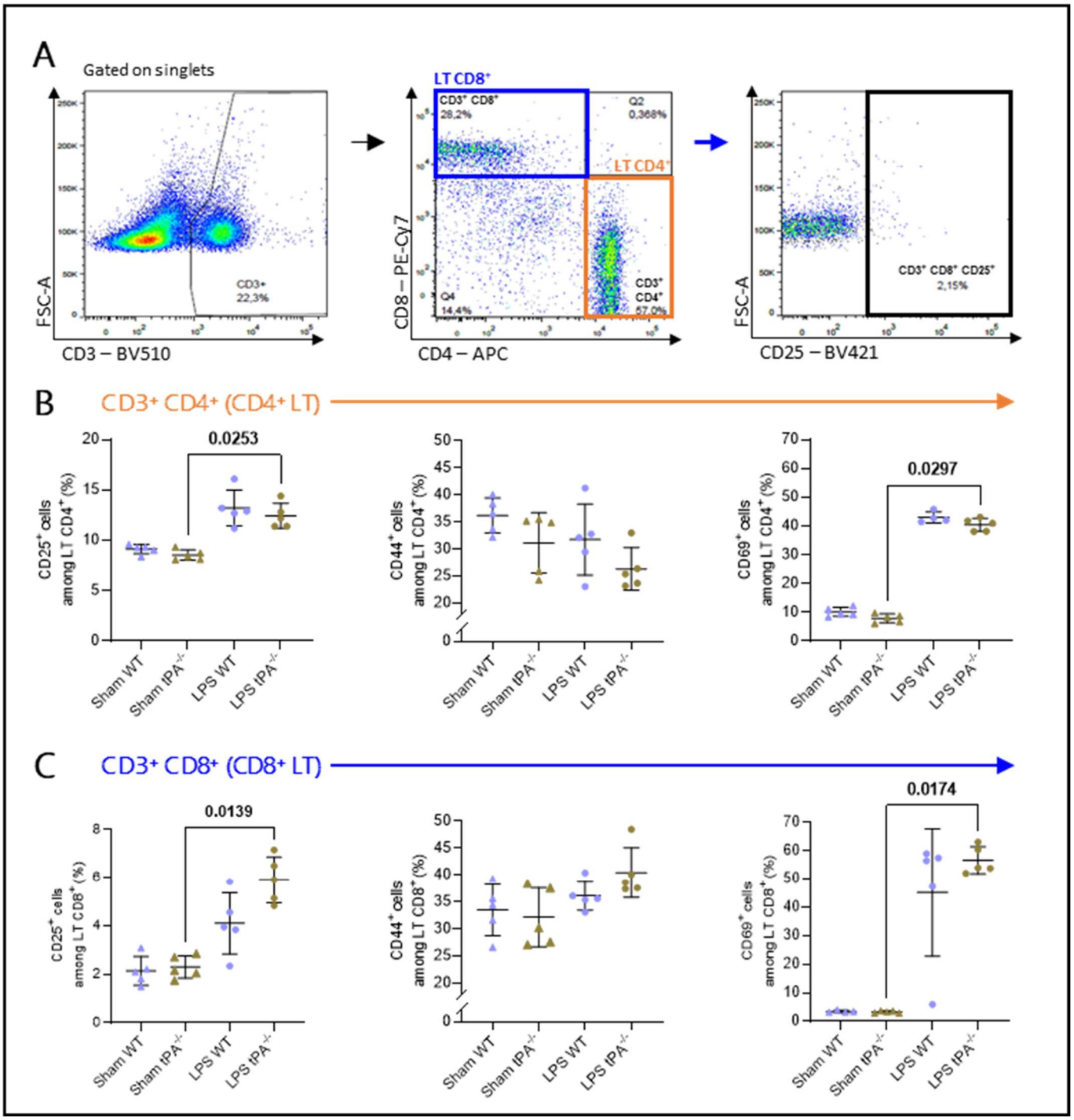
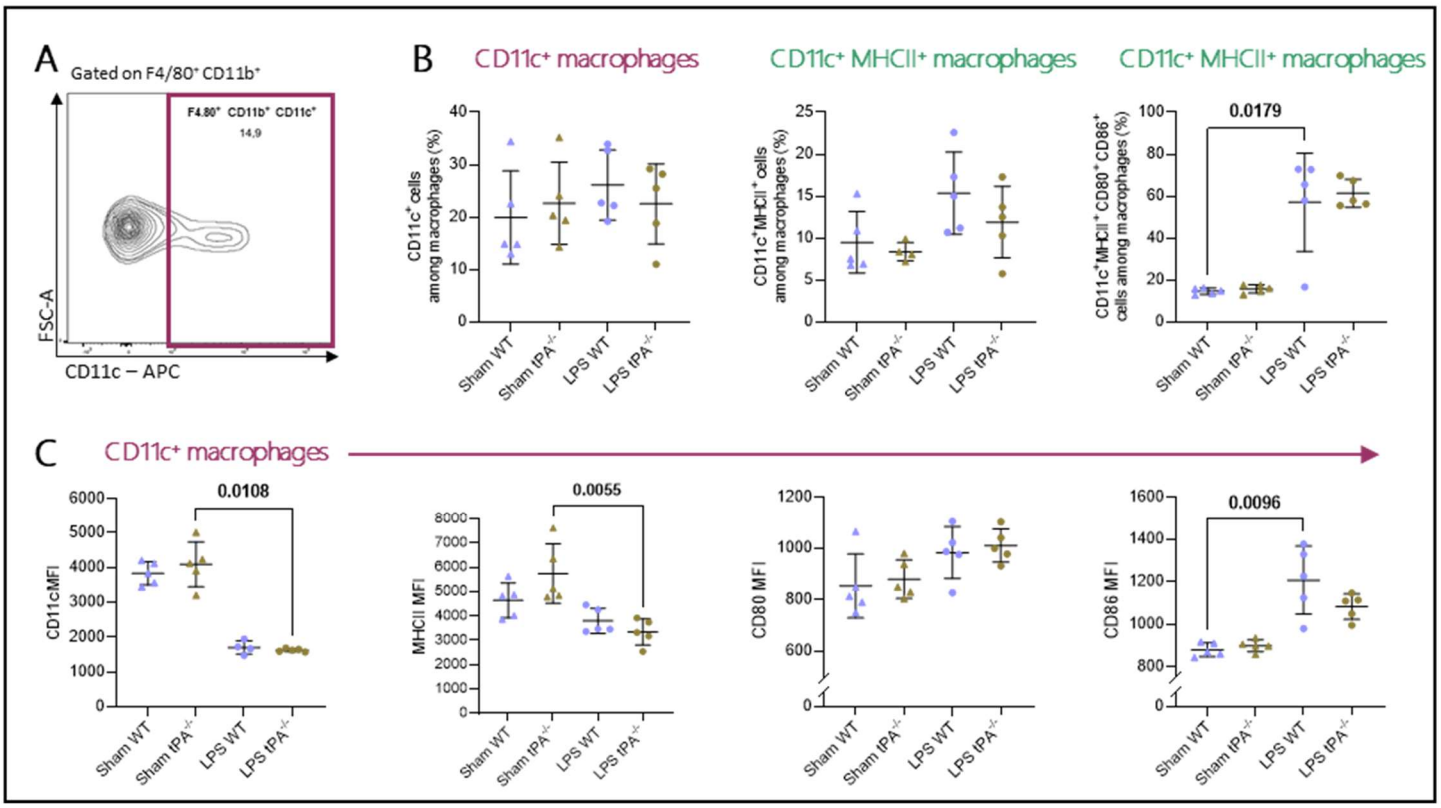

A
Gated on singlets
FSC-A
CD3 – BV510
CD3+
22,3%
LT CD8+
CD3+ CD8+
28,2%
Q2
0,368%
LT CD4+
CD8 – PE-Cy7
CD4 – APC
Q4
14,4%
CD3+
CD4+
57,0%
CD3+ CD8+ CD25+
2,15%
CD25 – BV421
B
CD3+ CD4+ (CD4+ LT)
CD25+ cells among LT CD4+ (%)
0.0253
CD44+ cells among LT CD4+ (%)
CD69+ cells among LT CD4+ (%)
0.0297
Sham WT
Sham tPA-/-
LPS WT
LPS tPA-/-
C
CD3+ CD8+ (CD8+ LT)
CD25+ cells among LT CD8+ (%)
0.0139
CD44+ cells among LT CD8+ (%)
CD69+ cells among LT CD8+ (%)
0.0174

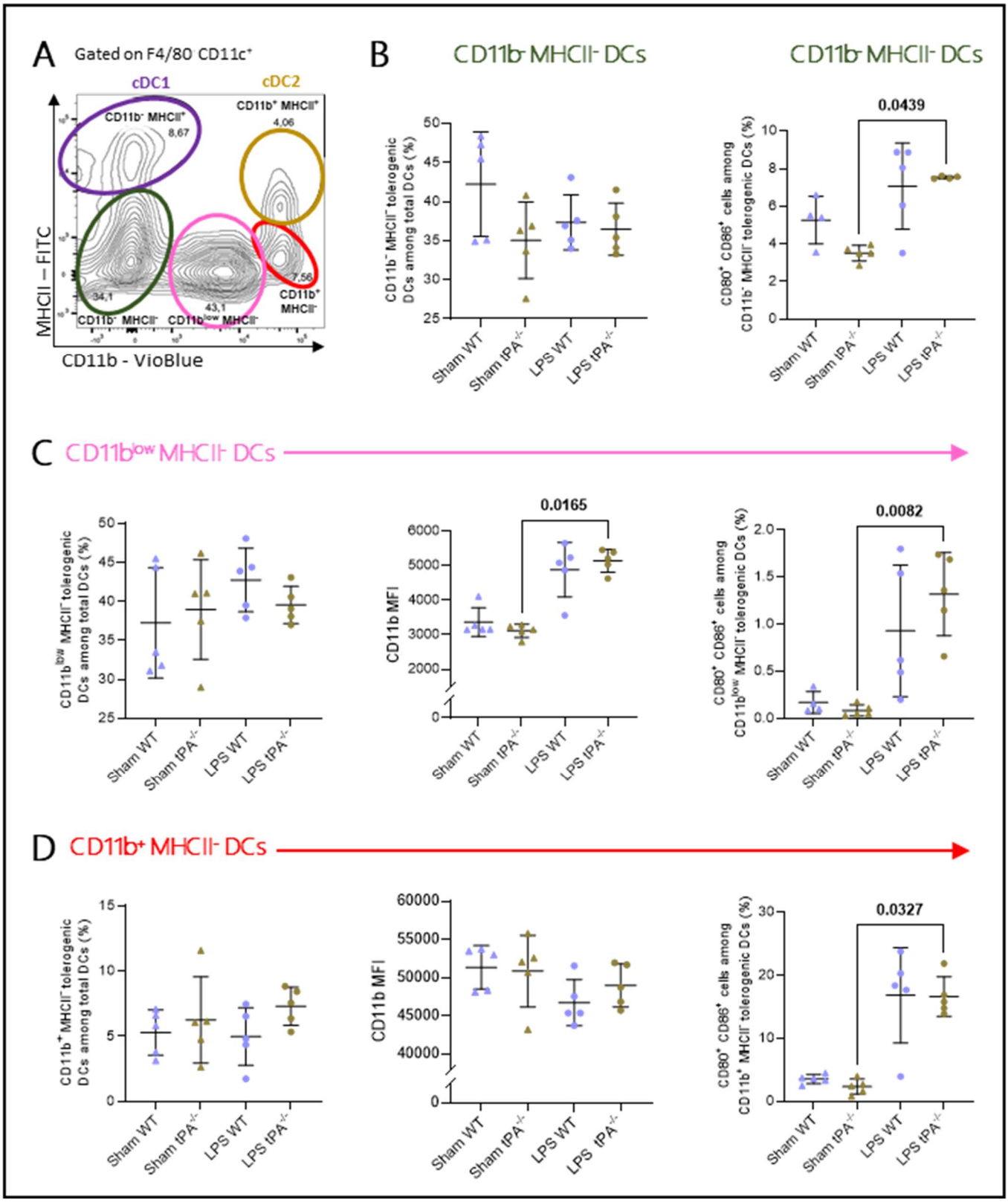
Figure 4: tPA modulates T cell activation during inflammation. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of LT, $CD8^+$ LT, $CD4^+$ LT, and activated $CD8^+$ LT ($CD3^+$ $CD8^+$ $CD25^+$). **B)** Quantification of $CD4^+$ or **C)** $CD8^+$ LT expressing CD25, CD44 or CD69 activation markers. Data are showed as individual animals with median ± SD, n=5, * $p<0.05$ by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

Supplementary data 1



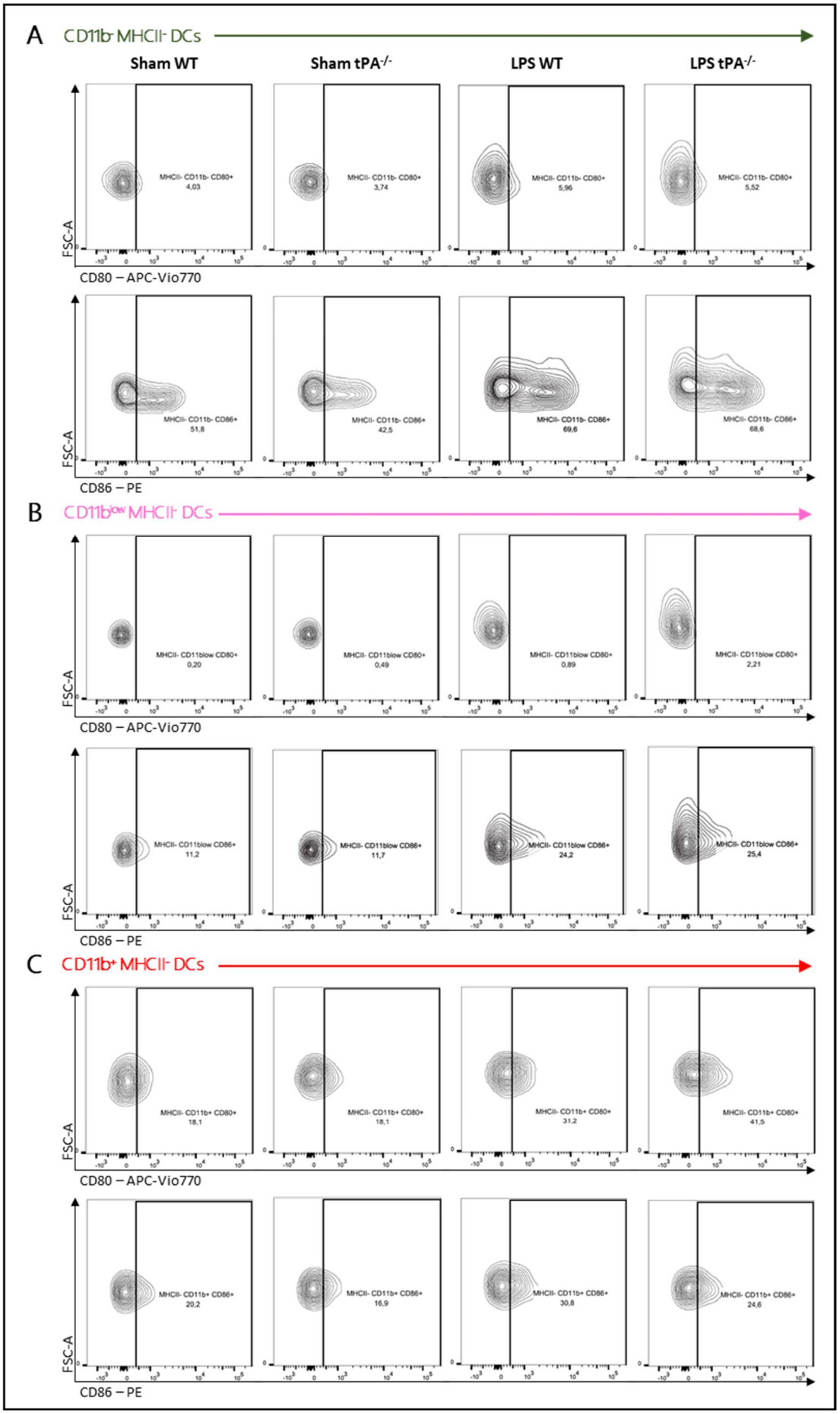
Supplementary data 1: Phenotype of CD11c macrophages subset after LPS injection in tPA$^{-/-}$ mice. **A)** Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of CD11c^{+} macrophages (F4/80^{+} CD11b^{+} CD11c^{+}). **B)** Quantification of CD11c^{+} macrophage frequency, expressing MHCII molecules (F4/80^{+} CD11b^{+} CD11c^{+} MHCII^{+}) and activation markers (F4/80^{+} CD11b^{+} CD11c^{+} MHCII^{+} CD80^{+} CD86^{+}). **C)** MFI quantification of CD11c, MHCII, CD80, CD86 molecules on CD11c^{+} macrophages. Data are showed as individual animals with median ± SD, n=5, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

Supplementary data 2



Supplementary data 2: Tolerogenic DC subset distribution upon inflammation in tPA$^{-/-}$ mice. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of three tolerogenic DC subets (F4/80^{-} CD11c^{+} CD11b^{-} MHCII^{-}; F4/80^{-} CD11c^{+} CD11b^{low} MHCII^{-}; F4/80^{-} CD11c^{+} CD11b^{+} MHCII^{-}. **B)** Quantification of CD11b^{-} MHCII^{-} and CD11b^{-} MHCII^{-} CD80^{+} CD86^{+} DC frequency. **C)** Quantification of CD11b^{low} MHCII^{-} DC frequency, MFI of CD11b on CD11b^{low} MHCII^{-} DCs, and CD11b^{low} MHCII^{-} CD80^{+} CD86^{+} DC frequency. **D)** Quantification of CD11b^{+} MHCII^{-} DC frequency, MFI of CD11b on CD11b^{+} MHCII^{-} DCs, and CD11b^{+} MHCII^{-} CD80^{+} CD86^{+} DC frequency. Data are showed as individual animals with median ± SD, n=5, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

Supplementary data 3



Supplementary data 3: Costimulatory molecules level expression on tolerogenic DC subsets. Representative flow cytometry analysis used for quantification of CD80 and CD86 MFI on **A)** $CD11b^{-}$ $MHCII^{-}$ DCs, **B)** $CD11b^{low}$ $MHCII^{-}$ DCs, and **C)** $CD11b^{+}$ $MHCII^{-}$ DCs.

REFERENCES

[1] J.M. Bennett, G. Reeves, G.E. Billman, J.P. Sturmberg, Inflammation-Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing "the Epidemic" of Chronic Diseases, Front Med (Lausanne). 5 (2018) 316. https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316.

[2] A. Gisterå, G.K. Hansson, The immunology of atherosclerosis, Nat Rev Nephrol. 13 (2017) 368–380. https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.51.

[3] J.E. Greb, A.M. Goldminz, J.T. Elder, M.G. Lebwohl, D.D. Gladman, J.J. Wu, N.N. Mehta, A.Y. Finlay, A.B. Gottlieb, Psoriasis, Nat Rev Dis Primers. 2 (2016) 16082. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.82.

[4] R. Caruso, B.C. Lo, G. Núñez, Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease, Nat Rev Immunol. 20 (2020) 411–426. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0268-7.

[5] M. Locati, G. Curtale, A. Mantovani, Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity, Annu Rev Pathol. 15 (2020) 123–147. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.

[6] K.A. Jablonski, S.A. Amici, L.M. Webb, J. de D. Ruiz-Rosado, P.G. Popovich, S. Partida-Sanchez, M. Guerau-de-Arellano, Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages, PLoS One. 10 (2015) e0145342. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342.

[7] S.C. Eisenbarth, Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function, Nat Rev Immunol. 19 (2019) 89–103. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0088-1.

[8] J.M. den Haan, S.M. Lehar, M.J. Bevan, CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells *in vivo*, J Exp Med. 192 (2000) 1685–1696. https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1685.

[9] C. Yamazaki, M. Sugiyama, T. Ohta, H. Hemmi, E. Hamada, I. Sasaki, Y. Fukuda, T. Yano, M. Nobuoka, T. Hirashima, A. Iizuka, K. Sato, T. Tanaka, K. Hoshino, T. Kaisho, Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1, J Immunol. 190 (2013) 6071–6082. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202798.

[10] A.E. Morelli, A.T. Larregina, W.J. Shufesky, A.F. Zahorchak, A.J. Logar, G.D. Papworth, Z. Wang, S.C. Watkins, L.D. Falo, A.W. Thomson, Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production, Blood. 101 (2003) 611–620. https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1769.

[11] C.A. Iberg, D. Hawiger, Natural and Induced Tolerogenic Dendritic Cells, J Immunol. 204 (2020) 733–744. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901121.

[12] E. Marín, M.C. Cuturi, A. Moreau, Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand?, Front Immunol. 9 (2018) 274. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00274.

[13] S.M. Opal, Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response, Crit Care Med. 28 (2000) S77-80. https://doi.org/10.1097/00003246-200009001-00017.

[14] M. Levi, T. van der Poll, Two-way interactions between inflammation and coagulation, Trends Cardiovasc Med. 15 (2005) 254–259. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.07.004.

[15] E.G. Sozmen, K. Akassoglou, Coagulation and immunity: Caught in the fibrin web, Immunity. 54 (2021) 2439–2441. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.10.016.

[16] L. Lin, K. Hu, Tissue plasminogen activator and inflammation: from phenotype to signaling mechanisms, Am J Clin Exp Immunol. 3 (2014) 30–36.

[17] B. Heissig, Y. Salama, S. Takahashi, T. Osada, K. Hattori, The multifaceted role of plasminogen in inflammation, Cell Signal. 75 (2020) 109761. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109761.

[18] C. Seillier, P. Hélie, G. Petit, D. Vivien, D. Clemente, B. Le Mauff, F. Docagne, O. Toutirais, Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response, Cell Immunol. 371 (2021) 104451. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104451.

[19] A.M. Thiebaut, M. Gauberti, C. Ali, S. Martinez De Lizarrondo, D. Vivien, M. Yepes, B.D. Roussel, The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond, Lancet Neurol. 17 (2018) 1121–1132. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5.

[20] J.R. Ward, S.K. Dower, M.K.B. Whyte, D.J. Buttle, I. Sabroe, Potentiation of TLR4 signalling by plasmin activity, Biochem Biophys Res Commun. 341 (2006) 299–303. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.188.

[21] T. Syrovets, M. Jendrach, A. Rohwedder, A. Schüle, T. Simmet, Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation, Blood. 97 (2001) 3941–3950. https://doi.org/10.1182/blood.v97.12.3941.

[22] C. Zalfa, P. Azmoon, E. Mantuano, S.L. Gonias, Tissue-type plasminogen activator neutralizes LPS but not protease-activated receptor-mediated inflammatory responses to plasmin, J Leukoc Biol. 105 (2019) 729–740. https://doi.org/10.1002/JLB.3A0818-329RRR.

[23] E. Mantuano, P. Azmoon, C. Brifault, M.A. Banki, A.S. Gilder, W.M. Campana, S.L. Gonias, Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity, Blood. 130 (2017) 1364–1374. https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-780205.

[24] R. Renckens, J.J.T.H. Roelofs, S. Florquin, A.F. de Vos, J.M. Pater, H.R. Lijnen, P. Carmeliet, C. van ’t Veer, T. van der Poll, Endogenous tissue-type plasminogen activator is protective during Escherichia coli-induced abdominal sepsis in mice, J Immunol. 177 (2006) 1189–1196. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1189.

[25] Y. Guo, J. Li, E. Hagström, T. Ny, Beneficial and detrimental effects of plasmin(ogen) during infection and sepsis in mice, PLoS One. 6 (2011) e24774. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024774.

[26] M.A. Sugimoto, A.L.C. Ribeiro, B.R.C. Costa, J.P. Vago, K.M. Lima, F.S. Carneiro, M.M.O. Ortiz, G.L.N. Lima, A.A.F. Carmo, R.M. Rocha, D.A. Perez, A.C. Reis, V. Pinho, L.A. Miles, C.C. Garcia, M.M. Teixeira, L.P. Sousa, Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1, Blood. 129 (2017) 2896–2907. https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-742825.

[27] R.J. Borg, A.L. Samson, A.E.-L. Au, A. Scholzen, M. Fuchsberger, Y.Y. Kong, R. Freeman, N.A. Mifsud, M. Plebanski, R.L. Medcalf, Dendritic Cell-Mediated Phagocytosis but Not Immune Activation Is Enhanced by Plasmin, PLoS One. 10 (2015) e0131216. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131216.

[28] Q. Cao, Y. Wang, X.M. Wang, J. Lu, V.W.S. Lee, Q. Ye, H. Nguyen, G. Zheng, Y. Zhao, S.I. Alexander, D.C.H. Harris, Renal F4/80+ CD11c+ mononuclear phagocytes display phenotypic and functional characteristics of macrophages in health and in adriamycin nephropathy, J Am Soc Nephrol. 26 (2015) 349–363. https://doi.org/10.1681/ASN.2013121336.

[29] M. Bosmann, J.J. Grailer, N.F. Russkamp, R. Ruemmler, F.S. Zetoune, J.V. Sarma, P.A. Ward, CD11c+ alveolar macrophages are a source of IL-23 during lipopolysaccharide-induced acute lung injury, Shock. 39 (2013) 447–452. https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31828f9c92.

[30] X. Li, T. Syrovets, F. Genze, K. Pitterle, A. Oberhuber, K.-H. Orend, T. Simmet, Plasmin triggers chemotaxis of monocyte-derived dendritic cells through an Akt2-dependent pathway and promotes a T-helper type-1 response, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 30 (2010) 582–590. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.202044.

[31] G. Liu, X.-P. Xia, S.-L. Gong, Y. Zhao, The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophages, J Cell Physiol. 209 (2006) 341–352. https://doi.org/10.1002/jcp.20732.

[32] P.H. Hart, D.R. Burgess, G.F. Vitti, J.A. Hamilton, Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator, Blood. 74 (1989) 1222–1225.

[33] P.S. Steeg, H.M. Johnson, J.J. Oppenheim, Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine: inhibitory effect of endotoxin, J Immunol. 129 (1982) 2402–2406.

[34] T.J. Koerner, T.A. Hamilton, D.O. Adams, Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA, J Immunol. 139 (1987) 239–243.

[35] R.A. Pengal, L.P. Ganesan, G. Wei, H. Fang, M.C. Ostrowski, S. Tridandapani, Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by the serine/threonine kinase Akt, Mol Immunol. 43 (2006) 1557–1564. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.09.022.

[36] S. Raziuddin, R.F. Kibler, D.C. Morrison, Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by bacterial lipopolysaccharides: inhibition of cell-mediated immunity, J Immunol. 127 (1981) 13–16.

[37] P. Hélie, C. Camacho-Toledano, L. Lesec, C. Seillier, A.J. Miralles, M.C. Ortega, S. Guérit, H. Lebas, I. Bardou, V. Vila-Del Sol, D. Vivien, B. Le Mauff, D. Clemente, F. Docagne, O. Toutirais, Tissue plasminogen activator worsens experimental autoimmune encephalomyelitis by complementary actions on lymphoid and myeloid cell responses, J Neuroinflammation. 18 (2021) 52. https://doi.org/10.1186/s12974-021-02102-5.

[38] L. Lin, C. Wu, K. Hu, Tissue plasminogen activator activates NF-κB through a pathway involving annexin A2/CD11b and integrin-linked kinase, J Am Soc Nephrol. 23 (2012) 1329–1338. https://doi.org/10.1681/ASN.2011111123.

[39] F.O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, F1000Prime Rep. 6 (2014) 13. https://doi.org/10.12703/P6-13.

[40] M. Nahrendorf, F.K. Swirski, Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function, Circ Res. 119 (2016) 414–417. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309194.

[41] L. Lin, K. Hu, Tissue-type plasminogen activator modulates macrophage M2 to M1 phenotypic change through annexin A2-mediated NF-κB pathway, Oncotarget. 8 (2017) 88094–88103. https://doi.org/10.18632/oncotarget.21510.

[42] L. Lin, Y. Jin, K. Hu, Tissue-type plasminogen activator (tPA) promotes M1 macrophage survival through p90 ribosomal S6 kinase (RSK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, J Biol Chem. 290 (2015) 7910–7917. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599688.

[43] S.B. Drutman, J.C. Kendall, E.S. Trombetta, Inflammatory spleen monocytes can upregulate CD11c expression without converting into dendritic cells, J Immunol. 188 (2012) 3603–3610. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102741.

[44] K.L. Griffiths, J.K.H. Tan, H.C. O'Neill, Characterization of the effect of LPS on dendritic cell subset discrimination in spleen, J Cell Mol Med. 18 (2014) 1908–1912. https://doi.org/10.1111/jcmm.12332.

[45] R.R. Ingalls, D.T. Golenbock, CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide, J Exp Med. 181 (1995) 1473–1479. https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1473.

[46] D.F. Draxler, F. Lee, H. Ho, C.B. Keragala, R.L. Medcalf, B. Niego, t-PA Suppresses the Immune Response and Aggravates Neurological Deficit in a Murine Model of Ischemic Stroke, Front Immunol. 10 (2019) 591. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00591.

[47] D.G. Hancock, E. Shklovskaya, T.V. Guy, R. Falsafi, C.D. Fjell, W. Ritchie, R.E.W. Hancock, B. Fazekas de St Groth, A systems biology approach to the analysis of subset-specific responses to lipopolysaccharide in dendritic cells, PLoS One. 9 (2014) e100613. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100613.

[48] V. Durai, K.M. Murphy, Functions of Murine Dendritic Cells, Immunity. 45 (2016) 719–736. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.010.

DISCUSSION

Discussion

Le rôle du tPA dans l'inflammation *via* sa fonction fibrinolytique et la génération de plasmine, ou *via* sa fonction cytokine-*like*, reste encore mal compris à ce jour.

Le tPA a des effets pro- ou anti-inflammatoires en fonction du contexte. Ses effets ont été presque exclusivement étudiés sur les macrophages, cellules clefs de l'inflammation. (Figure 27).

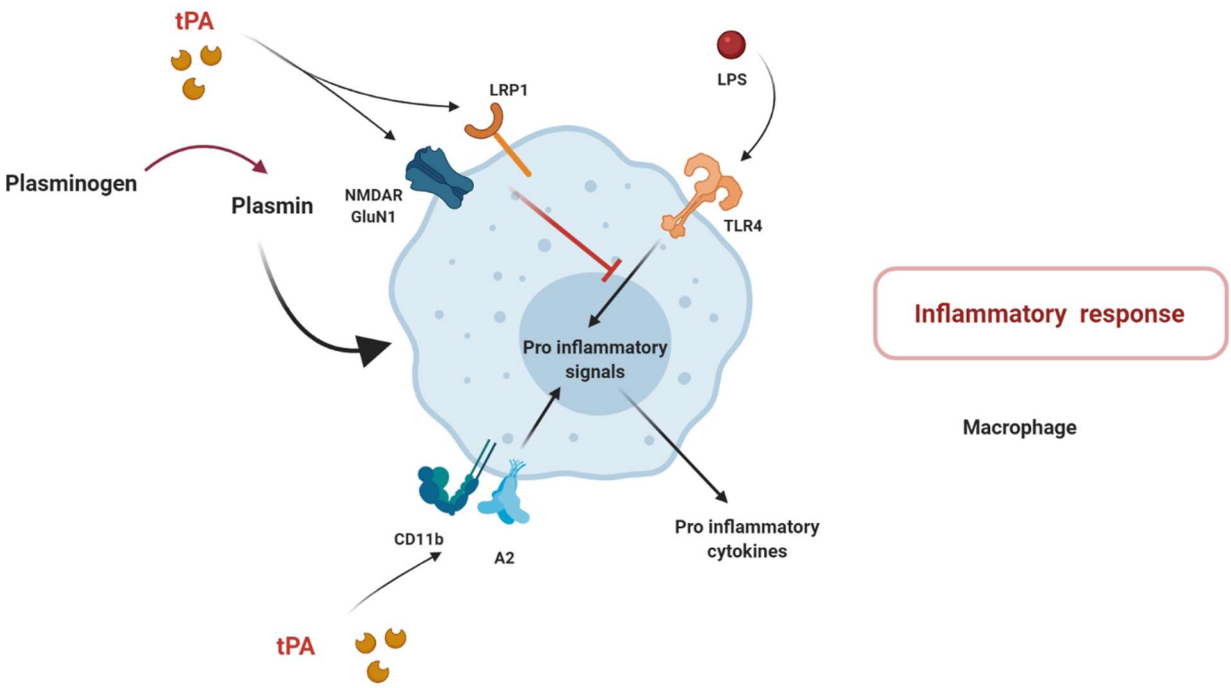


Figure 27 : Effets pro- ou anti-inflammatoires médiés par le tPA via son interaction avec ses différents récepteurs à la surface de macrophages.
Très schématiquement, la plasmine ainsi que l'interaction du tPA avec l'annexine II (A2)/CD11b induit des effets pro-inflammatoires, tandis que l'interaction du tPA avec les récepteurs NMDA et LRPs inhibe l'inflammation induite par le LPS.

Lin et collaborateurs ont démontré des effets pro-inflammatoires du tPA, indépendants de sa fonction protéolytique, à travers sa liaison aux récepteurs annexine II et CD11b (Lin, Wu and Hu, 2012). La présence de tPA engendre *in vitro*, l'agrégation et l'interaction de l'annexine II avec le CD11b à la surface des macrophages. Les auteurs ont montré qu'en se fixant à l'annexine II-CD11b, le tPA active la voie NF-κB dans les macrophages. Par ailleurs, les mêmes auteurs, en utilisant des souris $tPA^{-/-}$, ont montré que l'absence de tPA *in vivo* était corrélée à un déficit d'activation de la

voie NF-κB au niveau rénal, dans un modèle de maladie chronique induit par l'obstruction unilatérale d'uretère (OUU) (Lin, Wu and Hu, 2012).

À l'opposé, l'équipe de Steven Gonias a démontré des effets anti-inflammatoires du tPA médiés par son activité non protéolytique (Mantuano *et al.*, 2017). La sérine-protéase est capable d'inhiber *in vitro* la réponse des macrophages induite par le LPS en interagissant avec les récepteurs LRPs et au NMDA. Ainsi, le tPA sous forme enzymatiquement inactive bloque l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF, l'IL-1β ou l'IL-6, mais aussi celle de l'IL-10. La même équipe a démontré le rôle bimodal du tPA, anti-inflammatoire par son aspect « cytokine-like », mais favorisant l'activation des macrophages au travers de la génération de plasmine, à partir de plasminogène (Zalfa *et al.*, 2019).

In vivo, le rôle dual du tPA a été également démontré dans le modèle de neuroinflammation EAE. Notre équipe a montré que le score EAE est diminué chez les animaux $tPA^{-/-}$, accompagné d'une diminution de l'infiltration de cellules T et de macrophages dans le parenchyme cérébral, suggérant que le tPA est délétère dans l'EAE (Hélie *et al.*, 2021). D'autres équipes ont démontré des effets protecteurs du tPA potentiellement liés à son rôle fibrinolytique (East *et al.*, 2005; Dahl *et al.*, 2016; Mizrachi *et al.*, 2020). Les auteurs avancent l'hypothèse que le tPA, en dégradant les dépôts de fibrine au niveau du cerveau, limite leur effet pro-inflammatoire. Dans le modèle EAE, l'effet du tPA sur l'activation des macrophages, acteurs clefs de la neuroinflammation, n'a pas été étudié.

Les études retrouvées dans la littérature autour du tPA et de son implication dans les processus inflammatoires ont été menées majoritairement *in vitro* et ne permettent pas de conclure sur le ou les multiples rôles qu'exerce le tPA dans l'inflammation (Seillier *et al.*, 2022).

Afin de mieux comprendre l'implication du tPA dans la réponse immunitaire, nous avons choisi un modèle d'inflammation aiguë basée sur l'injection intrapéritonéale de LPS dans des animaux déficients en tPA. Le choix de ce modèle, par rapport à d'autres, tels que l'EAE, repose sur sa facilité d'exécution et sa robustesse. La mise en place du modèle EAE implique un temps d'induction de la pathologie plus long et sollicite les réponses immunitaires innée et adaptative, tandis que notre modèle est plus simple d'application et nous permet de mieux discriminer les réponses innées des macrophages et DCs.

Notre objectif a été d'étudier l'influence du tPA sur le phénotype *ex vivo* des effecteurs de la réponse immunitaire innée, que sont les macrophages et les DCs, en conditions physiologiques et inflammatoires.

1. Phénotype des macrophages spléniques après traitement au LPS

Dans notre étude, l'expression de molécules en lien avec l'état d'activation des macrophages (MHCII, CD80, CD86) a été analysée 24h après injection de LPS. Comme attendu, à l'état basal les macrophages expriment peu de molécules du MHCII et de molécules de co-stimulation et présentent un phénotype inactivé « tolérogène ». En condition inflammatoire, la fréquence de cellules exprimant les molécules du MHCII augmente. De la même façon et indépendamment de la présence de MHCII à la surface des macrophages, la fréquence des cellules exprimant les molécules de co-stimulation est plus élevé. Cependant, de manière inattendue, le niveau d'expression (MFI) des molécules du MHCII diminue sur les macrophages. À notre connaissance, ce phénomène n'est pas décrit sur les macrophages spléniques, dans un contexte *in vivo* de stimulation par le LPS. L'action inhibitrice du LPS sur l'expression des molécules du MHCII a été montrée *in vitro* au cours d'expériences anciennes dans lesquelles les macrophages ont été stimulés avec du LPS en association avec de l'IFN-γ ou de l'IL-4 (Steeg, Johnson and Oppenheim, 1982; Koerner, Hamilton and Adams, 1987; Hart *et al.*, 1996). Dans l'étude menée par Steeg, une lignée cellulaire macrophagique ($P388D_1$) a été utilisée et la présence des molécules du MHCII a été évaluée à la surface des macrophages après stimulation par du LPS et de l'IFN-γ, alors que dans l'étude de Koerner ce sont les macrophages péritonéaux qui ont été mis en culture en présence de LPS et d'IFN-γ et ce sont les transcrits des molécules MHCII qui ont été étudiés. Des effets inhibiteurs de PAMP sur l'expression de molécules de classe II ont déjà été décrits dans la littérature. Il a été montré que des motifs cytosine-phosphate-guanine (CpG) non méthylés ou la lipoprotéine LpqH de *Mycobacterium tuberculosis* induisent une diminution du MHCII sur les macrophages au travers de leur liaison au TLR-9 ou -2, respectivement (Chu *et al.*, 1999; Noss *et al.*, 2001). L'action de ces PAMPs est décrit comme un mécanisme d'échappement des pathogènes à la réponse immunitaire adaptative (Harding and Boom, 2010).

Par ailleurs, nous observons que l'effet inhibiteur du LPS est plus important dans les souris $tPA^{-/-}$, ce qui suggère que le tPA serait un facteur favorisant l'expression des molécules du MHCII. Cet effet est également observé dans les macrophages de phénotype M1, ainsi que dans une

population de DCs, les cDC2. Ceci est en accord avec des résultats obtenus au laboratoire où nous avons démontré que les macrophages spléniques et les DCs provenant de souris EAE expriment des niveaux plus importants de molécules MHCII après traitement de 24h *in vitro* par le tPA (Hélie *et al.*, 2021). Par ailleurs, il a été démontré, en utilisant un inhibiteur spécifique, que cet effet est médié par le récepteur à l'EGF. Néanmoins, la ou les voies de signalisation impliquées dans cette augmentation restent à identifier.

De plus, nous démontrons que les niveaux d'expression de CD11b sont augmentés par le LPS dans les populations de macrophages MHCII^{+} et dans les DCs « tolérogènes » MHCII^{-} CD11b^{low}. CD11b étant un récepteur au tPA avec un effet activateur sur les macrophages, notre résultat suggère que le tPA pourrait amplifier l'état d'activation de ces cellules. D'autre part, il a été rapporté que le LPS favoriserait l'expression de CD11b sur les neutrophiles en lien avec leur adhérence à l'endothélium et leur migration (Zhou *et al.*, 2005). Dans les souris tPA$^{-/-}$, une augmentation des molécules CD11b sur les macrophages MHCII^{-} en condition inflammatoire suggère que le tPA exercerait un rétrocontrôle négatif sur l'expression de son récepteur.

2. Implication du tPA dans la différenciation des macrophages M1/M2

De manière intéressante, nous avons montré que le LPS favorise le phénotype M1 (F4/80^{+} CD11b^{+} CD38^{+} iNOS^{+}) *in vivo*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lin et collaborateurs, qui montrent que le tPA favorise la survie des macrophages M1 *in vitro* et *in vivo* dans leur modèle de maladie rénale chronique induit par OUU (Lin, Jin and Hu, 2015). Cet effet est rendu possible par la liaison du tPA à son récepteur LRP, induisant l'activation de voie de signalisation MAP kinase. Ultérieurement, la même équipe a publié une étude dans laquelle, en utilisant une lignée de macrophages (J774), le tPA favorise la différenciation des macrophages M1 au détriment des macrophages M2 (Lin *et al.*, 2017). Toutefois, dans notre étude nous observons un maintien du marqueur CD206 associé au phénotype M2 (F4/80^{+} CD11b^{+} CD206^{+} Arg-1^{+}). À ce jour nous n'avons pas d'explication satisfaisante concernant cette discordance. Néanmoins, il a été observé, dans un modèle de pleurésie que l'injection de plasmin(ogène) induisait un phénotype M2 des macrophages (Sugimoto *et al.*, 2017). Ceci suggère que le tPA pourrait également avoir un rôle dans la résolution de l'inflammation.

Le concept M1/M2 a émergé suite à des études *in vitro* (Mills *et al.*, 2000). Des expériences complémentaires *in vitro* pourraient être réalisées pour mieux comprendre le rôle du tPA dans la

différenciation M1/M2 et évaluer l'impact du tPA exogène venant du milieu extracellulaire, et/ou endogène produit par les macrophages et pouvant agir de façon autocrine ou paracrine. Pour ce faire, il est envisageable de différencier des BMDMs en M1/M2 en présence de tPA exogène et/ou de différencier des BMDMs provenant de souris tPA$^{-/-}$.

Nous nous sommes également intéressés à une sous population de macrophages exprimant le marqueur CD11c et décrits comme très présents dans certains organes tels que les poumons (Poole *et al.*, 2012; Zaynagetdinov *et al.*, 2013). À ce jour, leur rôle spécifique n'est pas encore bien défini. Dans notre étude, les macrophages CD11c^{+} se comportent de façon similaire aux macrophages totaux (F4/80^{+} CD11b^{+}), en réponse au LPS et indépendamment du tPA. En présence de LPS, nous avons observé une diminution de l'expression des molécules CD11c portées à la surface des macrophages. Ce résultat a déjà été rapporté au niveau des cellules myéloïdes et pourrait s'expliquer par le fait que le CD11c/CD18 constituant un récepteur au LPS, diminue en surface des cellules lorsqu'il interagit avec son ligand (Ingalls and Golenbock, 1995; Griffiths, Tan and O'Neill, 2014). D'un point de vue fonctionnel, la diminution de CD11c sur les macrophages pourrait se traduire par une diminution de leur capacité de phagocytose de cellules apoptotiques, comme cela a été montré pour les DCs (Wu *et al.*, 2018).

3. Modulation de la répartition des DCs par le LPS et le tPA

Dans notre modèle, nous observons en condition inflammatoire, ainsi que chez les animaux déficients en tPA, une différence de répartition entre des populations cDC1 (F4/80^{-} CD11c^{+} MHCII^{+} CD11b^{-}) et cDC2 (F4/80^{-} CD11c^{+} MHCII^{+} CD11b^{+}), mais aussi des modifications de leur fréquence et niveaux d'expression des molécules de co-stimulation. Ces deux sous-populations de DCs possèdent des rôles différents dans l'immunité adaptative. Pour rappel, il a été montré que les cDC1 sont plutôt impliquées dans la différenciation des LT CD8^{+} grâce leur capacité à *cross*-présenter les antigènes extracellulaires, alors que les cDC2 ont plutôt un rôle dans la stimulation des LT CD4^{+} (Vu Manh *et al.*, 2015). Aussi, il pourrait être intéressant d'analyser les conséquences fonctionnelles de ces variations phénotypiques. Pour ce faire, il serait intéressant de les isoler *in vitro* à partir d'animaux tPA WT et tPA$^{-/-}$, ou bien, de les différencier séparément *in vitro* à partir d'HSCs de la moelle osseuse de souris et de comparer leurs fonctions (Kirkling *et al.*, 2018). Ainsi, nous pourrions évaluer leur capacité de phagocytose et de sécrétion de cytokines après stimulation par des signaux de danger. L'effet du tPA exogène pourrait également être évalué

dans ce contexte. Dans le but d'évaluer la capacité des cDCs à stimuler les réponses lymphocytaires T, nous pourrions utiliser des animaux OT I et OT II. Les LT des souris OT I possèdent un TCR transgénique reconnaissant spécifiquement un peptide de l'ovalbumine dans le contexte MHC de classe I, tandis que les LT de souris OT II possèdent un TCR transgénique reconnaissant un autre peptide de l'ovalbumine dans le contexte MHCII restreint. Suite à une stimulation antigénique, nous pourrions analyser la fréquence des cellules réactives, la capacité cytotoxique des LT $CD8^+$ et le profil de différenciation des LT $CD4^+$ *helpers* en fonction de l'apport de tPA.

En lien avec l'impact du tPA sur la fonction des DCs, nous avons entrepris une étude supplémentaire pour étudier le rôle du tPA dans l'immunité adaptative. En effet, des travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré que le tPA amplifie la prolifération et l'activation de LT *in vitro* (Hélie *et al.*, 2021). Nous avons immunisé des animaux $tPA^{-/-}$ (et leurs contrôles) avec une protéine à fort pouvoir immunogène, la KLH (*keyhole limpet haemocyanin*), induisant une réponse lymphocytaire B dépendante des LT. Nous avons effectué une analyse par cytométrie en flux, des populations cellulaires spléniques de l'immunité adaptative et n'avons observé aucune différence entre les conditions WT et $tPA^{-/-}$, ainsi qu'entre les conditions sans stimulation antigénique (Sham) et avec stimulation par la KLH (**Figure 28**). De plus, nous avons prévu de comparer la production de cytokines des splénocytes de ces souris après réactivation *in vitro* par l'antigène. Les données de cette étude pourraient apporter un éclairage sur les capacités stimulantes des cDCs *in vivo*, en présence ou non de tPA. Ce travail est encore en cours de finalisation et ne peut malheureusement être présenté dans ce manuscrit.

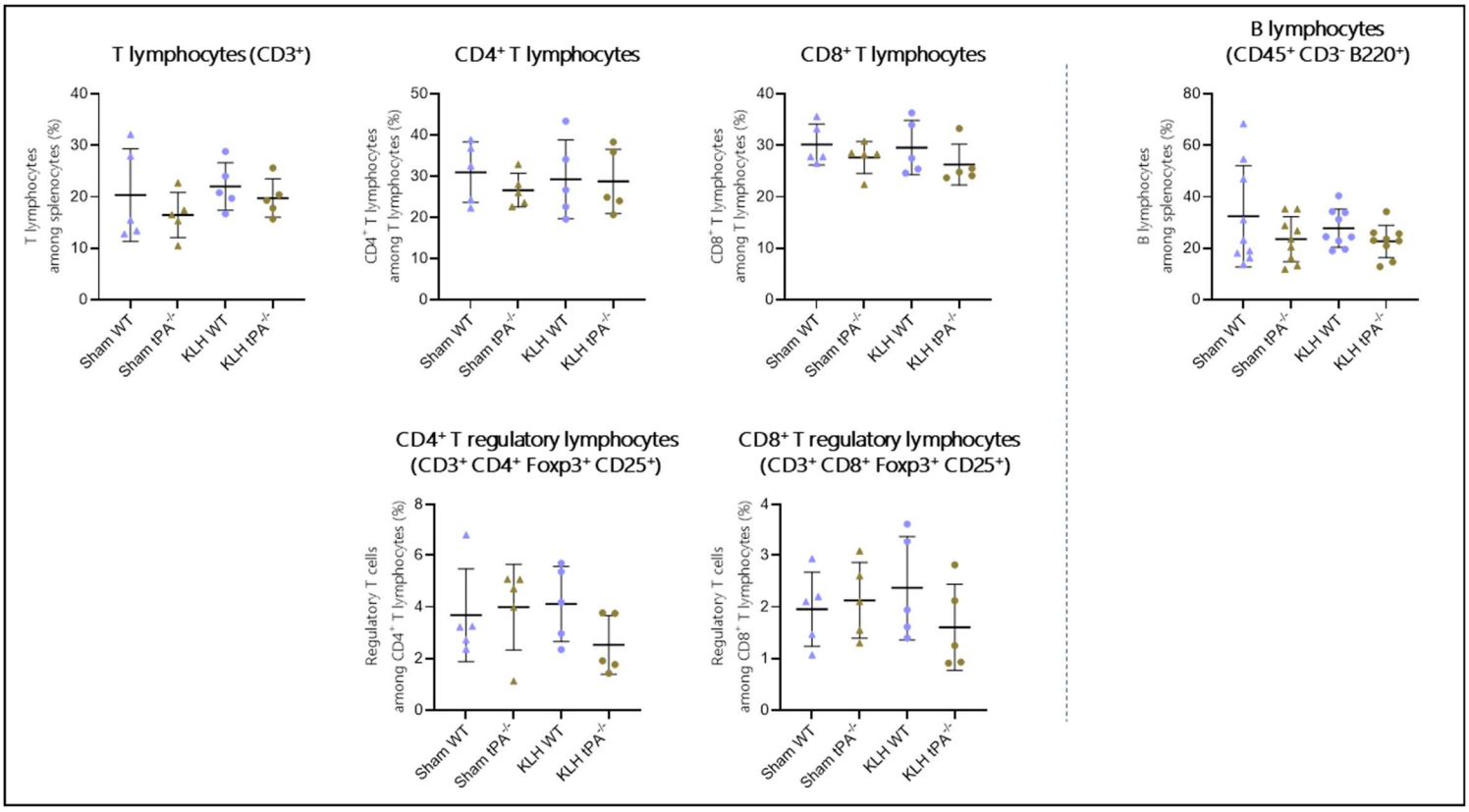


Figure 28 : Étude de l'impact de la délétion du tPA sur le phénotype des cellules de l'immunité adaptative, après immunisation par la KLH.

Après immunisation d'animaux WT et tPA$^{-/-}$ avec l'antigène de la KLH, un immunophénotypage a été effectué sur les cellules de la rate. Les mêmes résultats ont été observés à partir des ganglions lymphatiques (inguinaux, brachiaux, cervicaux).

Le tPA ne modifie pas de façon importante le phénotype des 3 populations de DCs « tolérogènes » (F4/80^{-} CD11c^{+} MHCII^{-} CD11b$^{+/low/-}$). De façon intéressante, nous observons que ces populations présentent des phénotypes différents en ce qui concerne l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Le CD80 est peu exprimé à l'état basal et peu augmenté en présence de LPS, à la différence du CD86. La contribution respective de CD80 et CD86 dans la réponse immunitaire reste peu connue à ce jour. Néanmoins, il a été montré, en utilisant des souris CD80$^{-/-}$ ou CD86$^{-/-}$ que ces molécules de co-stimulation jouent un rôle différent dans un modèle de septicémie. À l'inverse de CD86, CD80 est associé à une amplification de la réponse inflammatoire *in vivo*, ainsi qu'à une moins bonne survie des animaux dans un modèle de septicémie induit par ligature-ponction caecale (Nolan *et al.*, 2009). Sans le démontrer, les auteurs suggèrent que l'effet de CD80 serait lié à une interaction avec les neutrophiles qui expriment CD28. Dans une autre étude, il a été montré que les molécules de co-stimulation ont des rôles opposés dans la fonction immunosuppressive des LTregs, avec un rôle inhibiteur de

CD86 et activateur de CD80 (Zheng *et al.*, 2004). Dans la littérature, nous avons identifié une unique référence abordant l'existence d'un phénotype de DCs tolérogènes (CD11c$^+$ MHCII$^-$ CD11b$^-$) dans la rate (Griffiths, Tan and O'Neill, 2014). Les auteurs ont caractérisé cette population de DCs spléniques qu'ils ont nommé « p-preDCs » pour *plasmacytoïd-pre-DCs*, possédant des fonctions indéterminées à notre connaissance. De plus, ils ont mis en évidence une population nommée « L-DCs » en comparaison à un type de DCs spléniques immatures différenciées *in vitro*, appelées « LTC-DCs » pour *long-term culture* DCs. Ces cellules possèdent un phénotype CD11c$^+$, CD11b$^+$, CD8$^-$, MHCII$^-$ et sont très efficaces pour effectuer la *cross*-présentation (Tan *et al.*, 2011; Griffiths, Tan and O'Neill, 2014). De la même façon que pour les cDCs, nous pourrions isoler les DCs « tolérogènes » à partir d'animaux tPA WT et tPA$^{-/-}$ et mieux caractériser leurs fonctions respectives.

4. Implication du tPA dans l'activation lymphocytaire T après traitement au LPS

Bien que le LPS soit connu pour induire un réponse immunitaire innée, il est possible qu'il ait un impact indirect sur la réponse adaptative. De plus, les macrophages et DCs étant des cellules à l'interface des 2 types d'immunité, nous avons souhaité étudier l'activation des LT. En condition inflammatoire, tant pour les LT CD4$^+$ que pour les LT CD8$^+$, nous observons une augmentation de la fréquence de cellules CD25$^+$ et CD69$^+$. Le CD69 est un marqueur d'activation précoce, précédant la prolifération des lymphocytes, tandis que le CD25 est un marqueur d'activation plus tardif que le CD69 (Caruso *et al.*, 1997). L'absence de tPA régule à la hausse l'expression de ces 2 marqueurs sur les LT CD8$^+$ en présence de LPS, tandis qu'ils sont légèrement diminués dans les LT CD4$^+$. Ainsi, le tPA favoriserait l'activation lymphocytaire T CD4$^+$ en condition inflammatoire.

5. Limites et perspectives

Au cours des expériences de stimulation par le LPS, nous avons récupéré le sérum des animaux. Nous avons prévu d'analyser très prochainement l'expression de cytokines (IFN-γ, IL-1β, IL-4, IL-10, TNF, IL-17, MCP-1) *via* une technique ELISA. Ces données constitueront un élément important pour conclure sur l'effet pro- ou anti-inflammatoire du tPA *in vivo*.

Une des limites de notre étude est l'utilisation d'un nombre de marqueurs phénotypiques limité, du fait de la configuration de notre cytomètre. Rétrospectivement, un marqueur de lignage aurait été utile car la population de macrophages dans la rate est faiblement représentée. Nous aurions

ainsi pu exclure de l'analyse, grâce à l'utilisation d'anticorps couplés à un unique fluorochrome, les LT (CD3), les LB (B220), les NK (NK 1.1) et les neutrophiles (Ly6G). De plus, nous aurions pu utiliser d'autres marqueurs de co-stimulation des macrophages, tels que le CD40. Aussi, pour discriminer plus finement les phénotypes de DCs conventionnelles, l'utilisation de CD8α et XCR1 nous aurait permis d'identifier plus précisément les cDC1, alors que le marqueur SIRPα aurait été utile pour les cDC2. Enfin, bien que les marqueurs M1/M2 utilisés dans notre étude soient appropriés, d'autres marqueurs auraient pu être utilisés, tels qu'Egr2, caractéristique des macrophages M2 (Jablonski *et al.*, 2015).

Outre l'exploitation de marqueurs complémentaires, il aurait été avantageux d'évaluer les profils M1 et M2 avec un seul panel d'anticorps de cytométrie et non séparément. Nous aurions ainsi pu évaluer la pertinence des marqueurs qui devraient exclure les populations M1 des populations M2, et *vice versa*, ou au contraire, démontrer un continuum entre ces deux populations macrophagiques *in vivo*, comme cela est suggéré par certains auteurs (Nahrendorf and Swirski, 2016).

Afin de caractériser de manière plus fine les différents types cellulaires étudiés et observer l'effet de la délétion en tPA, nous pourrions utiliser une approche holistique de tri des sous-populations de macrophages et DCs et de séquençage des transcrits d'ARN par *single-cell RNAseq*.

Il est connu que les macrophages spléniques et péritonéaux sont différents, tant dans leurs morphologies, que dans leurs phénotypes et fonctions (Liu *et al.*, 2006). Dans notre modèle, nous étudions les macrophages spléniques après injection intrapéritonéale de LPS. Il pourrait donc être intéressant d'étudier l'impact du tPA, en condition inflammatoire, sur la répartition des macrophages péritonéaux. Le protocole que l'on utilise nous permettrait de réaliser cela facilement, *via* un lavage péritonéal, nous apportant des données supplémentaires.

Nous avons étudié les macrophages et DCs au niveau de la rate. Or, le LPS possède des effets systémiques. Notre laboratoire étudie le rôle du tPA dans le contexte de la neuroinflammation. Cette molécule étant fortement présente au niveau du SNC, il serait intéressant de regarder de phénotype des macrophages présents dans cet organe. Pour ce faire, il faudrait explorer les zones riches en macrophages et DCs, telles que les espaces périvasculaires, les plexus choroïdes ou les méninges. Cela nous donnerait des informations importantes sur le mode d'activation de ces cellules, en lien avec le tPA, dans le contexte d'une neuroinflammation (Meneses *et al.*, 2019).

Notre modèle d'étude du tPA est un modèle d'inflammation aiguë. Plusieurs pathologies du SNC, telles que l'AVC ischémique, sont associées à l'inflammation chronique chez le patient (Shi *et al.*, 2019). Pour mettre en place un modèle d'inflammation chronique, il semble inopportun de procéder à des injections répétées de LPS car une tolérance pourrait s'installer (Locati, Curtale and Mantovani, 2020). Néanmoins, un modèle chronique d'inflammation pourrait être obtenu *via* l'utilisation alternative de différents agents pathogènes, administrés à faibles doses et à intervalle régulier.

Enfin, l'étude du rôle du tPA dans l'inflammation est d'intérêt pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de certaines maladies avec une composante coagulopathique. En effet, dans la septicémie ou la COVID, une forte inflammation est présente au niveau vasculaire, associée à des phénomènes d'immunothromboses (Bonaventura *et al.*, 2021). Dans ce contexte, le tPA a été proposé comme une thérapeutique potentielle pour sa propriété fibrinolytique. Cependant, il possède également des fonctions pro-inflammatoires, aussi, son effet bénéfice/risque doit être évalué avec précaution.

Des anticorps anti-tPA ont été mis en évidence dans certaines maladies auto-immunes, telles que le syndrome des anticorps anti-phospholipides, responsable de thromboses veineuses ou artérielles (Cugno *et al.*, 2004). Les effets des auto-anticorps anti-tPA reste encore peu étudiée mais il a été démontré qu'ils peuvent bloquer l'activité catalytique du tPA. Il serait intéressant d'analyser, chez les patients présentant ou non ces auto-anticorps anti-tPA, l'état d'activation des monocytes circulants.

CONCLUSION

Conclusion

Nous avons mesuré l'effet de l'absence de tPA dans plusieurs populations de cellules immunitaires, en conditions physiologiques et inflammatoires. Nous pouvons conclure, qu'en condition inflammatoire, le tPA a un impact sur l'expression des molécules du MHCII sur les macrophages, l'activation des macrophages M1, ainsi que sur la répartition des populations de cDCs. La plasmine a des effets pro-inflammatoires importants sur les macrophages. En utilisant des souris $tPA^{-/-}$ nous supprimons une source importante d'activateur du plasminogène, mais il demeure néanmoins présent l'uPA, le second activateur du plasminogène. Pour déterminer la contribution globale du plasmin(ogène) dans l'activation des macrophages, une étude similaire à la nôtre pourrait être réalisée avec des animaux, à la fois $tPA^{-/-}$ et $uPA^{-/-}$. Plusieurs études ont évalué le rôle du tPA, *in vitro*, dans la réponse macrophagique en s'attachant à un, ou des récepteurs particuliers du tPA (CD11b/Annexine II, LRPs, NMDA). Dans l'idéal, une étude systématique *in vitro* ciblant l'ensemble des récepteurs du tPA avec des anticorps bloquants ou des approches d'inhibition de gènes serait pertinente pour déterminer sa fonction exacte dans la réponse inflammatoire.

AUTRES TRAVAUX

Hélie *et al. Journal of Neuroinflammation* (2021) 18:52
https://doi.org/10.1186/s12974-021-02102-5

Journal of Neuroinflammation

RESEARCH Open Access

Tissue plasminogen activator worsens experimental autoimmune encephalomyelitis by complementary actions on lymphoid and myeloid cell responses

Pauline Hélie[1,2†], Celia Camacho-Toledano[3†], Léonie Lesec[1], Célia Seillier[1], Antonio J. Miralles[3], Maria Cristina Ortega[3], Sylvaine Guérit[1], Héloïse Lebas[1], Isabelle Bardou[1], Virginia Vila-del Sol[4], Denis Vivien[1,5], Brigitte Le Mauff[1,6], Diego Clemente[3†], Fabian Docagne[1*†] and Olivier Toutirais[1,6†]

Abstract

Background: Tissue plasminogen activator (tPA) is a serine protease involved in fibrinolysis. It is released by endothelial cells, but also expressed by neurons and glial cells in the central nervous system (CNS). Interestingly, this enzyme also contributes to pathological processes in the CNS such as neuroinflammation by activating microglia and increasing blood–brain barrier permeability. Nevertheless, its role in the control of adaptive and innate immune response remains poorly understood.

Methods: tPA effects on myeloid and lymphoid cell response were studied *in vivo* in the mouse model of multiple sclerosis experimental autoimmune encephalomyelitis and *in vitro* in splenocytes.

Results: $tPA^{-/-}$ animals exhibited less severe experimental autoimmune encephalomyelitis than their wild-type counterparts. This was accompanied by a reduction in both lymphoid and myeloid cell populations in the spinal cord parenchyma. In parallel, tPA increased T cell activation and proliferation, as well as cytokine production by a protease-dependent mechanism and *via* plasmin generation. In addition, tPA directly raised the expression of MHC-II and the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 at the surface of dendritic cells and macrophages by a direct action dependent of the activation of epidermal growth factor receptor.

(Continued on next page)

* Correspondence: docagne@cyceron.fr
†Pauline Hélie, Celia Camacho-Toledano, Diego Clemente, Fabian Docagne and Olivier Toutirais contributed equally to this work.
[1]UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Normandie Univ, Caen, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)
Conclusions: Our study provides new insights into the mechanisms responsible for the harmful functions of tPA in multiple sclerosis and its animal models: tPA promotes the proliferation and activation of both lymphoid and myeloid populations by distinct, though complementary, mechanisms.

Keywords: Tissue plasminogen activator, Neuroinflammation, Experimental autoimmune encephalomyelitis, T cell response, Antigen-presenting cells

Background

Multiple sclerosis (MS) is a chronic disease of the central nervous system (CNS) characterized by lymphoid and myeloid cell infiltration and microglial activation, leading to demyelination and progressive neurodegeneration [1]. Tissue plasminogen activator (tPA), a serine protease involved in fibrinolysis [2], is mainly produced by endothelial cells of vessels [3], whereas this protease is also secreted by several cell types within the CNS such as oligodendrocytes [4], astrocytes [5], or neurons [5, 6]. tPA influences neuroinflammatory and neuroimmune processes [7]. Indeed, its effects are particularly relevant to the context of MS: tPA activity is increased by tenfold in the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients [8], and the protease is found in the perivascular spaces associated to active MS plaques [9].

Myelin oligodendrocyte glycoprotein $(MOG)_{35\text{-}55}$-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a well-established animal model of MS, is characterized by the recruitment and entry of $CD4^+$ encephalitogenic T cells into the CNS parenchyma [10]. Interestingly, pioneer studies reported that tPA activity is increased in EAE [11, 12] and that tPA-deficient mice ($tPA^{-/-}$) declare EAE later than their wild-type (WT) counterparts, with less severe symptoms in the early phase of the disease, reduced demyelination, axonal damage, microglial activation, and T cell presence in the parenchyma [11]. Later studies in slightly different experimental designs drew opposite conclusions, showing earlier and more severe disease in $tPA^{-/-}$ mice [13]. This indicates that tPA can provide different effects in the EAE course, depending on the phase of the disease and the experimental design.

Several actions of tPA can participate in its controversial effects in EAE. In addition to its protease activity, tPA exerts various functions due to its five distinct functional domains: finger domain, epidermal growth factor (EGF)-like domain, kringle 1, kringle 2, and protease domain [14]. We have previously shown that tPA, by activating the EGF receptor (EGFR), has an anti-apoptotic effect over oligodendrocytes [4] and a chemotactic effect on their progenitors that helps remyelination after chemically induced white matter lesions [15]. tPA is also able to increase blood–brain barrier (BBB) permeability and helps leukocyte diapedesis [16] by several mechanisms, including the potentiation of endothelial N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) [17] or tight junction disruption by the modification of occludin phosphorylation [18]. Our group has shown that Glunomab®, a monoclonal antibody which prevents the binding of tPA on the GluN1 subunit of NMDAR [19], inhibits leukocyte entry into the CNS, thus blocking demyelination and EAE progression [17].

In addition to these actions, controversial data indicate that tPA may directly act on cells of the innate immunity. tPA can regulate myeloid cell functions, but the pro- or anti-inflammatory nature of this action is still a matter of debate [20, 21]. On the other hand, the possible role of tPA on lymphoid cell activity is still poorly understood [7]. Therefore, the purpose of this study is to investigate the respective actions of tPA on lymphoid and myeloid cells in the context of EAE. Interestingly, we report a deleterious role of tPA in EAE, that may be due to an increase in T cell proliferation, combined to a direct potentiation of dendritic and macrophage antigen presenting function. These combined effects of tPA converge to the promotion of pro-inflammatory T cell adaptive immune response in EAE.

Methods

Animals

Transgenic $tPA^{-/-}$ (C57BL/129 background) [22] and C57BL/129 control mice, aged 8–12 weeks, were provided by the *Centre Universitaire de Ressources Biologiques* (CURB, University of Caen, France). C57BL6/J mice aged 6–12 weeks were obtained from Janvier Laboratories. Mice were housed in our local conventional animal facilities. All procedures were performed according to the guidelines of the institutional ethics committee (*Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale* (CeNomExa) and *Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Nacional de Parapléjicos*). This was submitted to these committees for approval in accordance with the European directive no. 2013/63/UE (agreement number D14118001) and with the French and Spanish National and Regional Guidelines for Animal Experimentation and the Use of Genetically Modified Organisms (French Ministry of Research, project license number 02653.2, Decree 87/848;

RD 53/2013 and 178/2004, Law 32/2007 and 9/2003, Decree 320/2010).

Reagents

Recombinant human tPA (Actilyse ®) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany). Several controls of tPA and other reagents were used along the study: dialyzed tPA, tPA GGACK, or corresponding vehicles (DMSO, Sigma-Aldrich). tPA dialysis was performed for 48 h at 4 °C against 0.3 M HEPES to remove the arginine vehicle. tPA GGACK was obtained by incubating GGACK (1,5-dansyl-L-glutamyl-L-glycyl-L-arginine chloromethylketone, EMD) with Actilyse in a fourfold molar excess for 6 h at room temperature (RT), followed by dialysis for 48 h at 4 °C with 0.3 M HEPES to remove unbound GGACK and the arginine vehicle. The loss of proteolytic activity of tPA GGACK was confirmed with spectrozyme assay (American Diagnostica) [4]. Aprotinin and epsilon-aminocaproic acid (ε-ACA) were purchased from Sigma-Aldrich. AG1478 hydrochloride was purchased from Tocris. Antibodies used in this study are listed in Suppl. Table 1.

EAE induction

Monophasic EAE was induced in 6–12-week-old C57BL6/J female and C57BL/129 $tPA^{-/-}$ male mice by active immunization with MOG_{35-55} peptide (Cambridge Research Biochemicals, Genscript). To this end, mice were injected subcutaneously with 200 μg of Complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich) containing 400 μg of inactivated particles of *Mycobacterium tuberculosis* (BD Biosciences). The emulsion was administered to regions above the shoulders and the flanks into four sites (50 μL at each injection site). All animals were intraperitoneally injected at days 0 and 2 with 250 ng of pertussis toxin (Sigma-Aldrich) in 200 μL of saline. Mice were weighted and scored daily in a double blind manner for clinical signs of EAE as follows: 0, no disease; 1, limp tail; 2, hindlimb weakness/ no hindlimb reflex; 3, hindlimb paresis; 4, hindlimb paralysis; 5, moribund or dead. In accordance with the ethical standards and regulations, the humane endpoint criteria were applied when an animal reached a clinical score of ≥ 4 for more than 48 h or presented signs of stress or pain (generation of sounds, stereotypic behavior, lordokyphosis, hair loss, or loss of weight superior to 2 g/day for more than 48 h).

Isolation of leukocytes from spleens and spinal cords

Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane (Aerrane, Baxter) and transcardially perfused with 50 mL of cold phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS, Sigma-Aldrich). Spinal cords were harvested at the EAE plateau phase [day post-immunization (dpi) 20 ± 3] and homogenized in PBS. Leukocytes were recovered at the 30:70% Percoll (Fisher Scientific) interface after gradient centrifugation as described in the literature [23] and were then counted with the Malassez chamber. Spleens were aseptically removed from naïve and MOG-immunized C57BL/6 mice at the peak of clinical score (≥ 3, dpi 15–18), as described previously [24], mechanically processed to obtain a splenocyte suspension by passing the cells through a 40-μm filter (Falcon). Erythrocytes were lysed in lysis buffer [0.15 M NH4Cl, 9 mM HKCO3, 0.5 M EDTA, pH 7.4 (Stemcell Technologies)], and the sterile splenocytes were resuspended in supplemented sterile PBS with 10% filtered and inactivated fetal bovine serum (FBS, Stemcell Technologies), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco), and 2.5% (v/v) HEPES (Fisher).

Analysis of the effect of tPA on myeloid cell functions

Splenocytes (10^6 per well in 24 well plates) were cultured and maintained in RPMI (Gibco) supplemented with 10% FBS (Linus), 1% Penicillin/Streptomycin, 2.5% (v/v) HEPES, 2 mM L-glutamine (Gibco), and 50 μM β-mercaptoethanol in the presence of the following molecules for 24 h: tPA (0.2, 2, and 20 μg/mL) or its vehicle [34.84 mg/mL arginine (Sigma-Aldrich), 10.72 mg/mL phosphoric acid (Sigma-Aldrich) and 0.1 mg/mL Tween 80 (Sigma-Aldrich)], Glunomab® antibody (10 μg/mL) or its isotypic control [17], 2 μg/mL tPA-GGACK (with blocked serine protease activity), 5 μM of the EGFR inhibitor (AG1478 hydrochloride, additional 30-min preincubation).

Analysis of the effect of tPA on lymphoid cell proliferation

Naive splenocytes (1.5×10^6/mL in suspension) were incubated for 20 min at RT in PBS with 0.5 μM CFSE (Life technologies). Cells were then washed and suspended in complete DMEM containing: 1% penicillin–streptomycin (P/S, Sigma-Aldrich), 1% GlutaMax-I 100X (Gibco), 10% FBS, and 0.1% β-mercaptoethanol. Ninety six-well U-bottom plates were coated with 1 μg/mL anti-mouse CD3 antibody (eBioscience) in PBS overnight. The plates were washed twice with 200 μL of PBS and 10^5 labelled splenocytes were plated (P96 well) in 200 μl of complete DMEM and incubated for 96 h with 1 μg/mL anti-mouse CD28 antibody (eBioscience) in the presence or not of tPA at different concentrations (0.1, 1, and 10 μg/ml [4], 10 μg/ml Glunomab® antibody or its isotypic control [17], ε-ACA, an inhibitor of the protease function of tPA (200 mM), the plasmin inhibitor aprotinin (20 IU/mL^{-1}) [25], or tPA-GGACK (10 μg/mL). Then, cells were harvested by centrifugation (2000 rpm, 10 min, RT), washed in PBS and stained for the flow cytometry assay. To study the effect of tPA during MOG-induced

stimulation, splenocytes were obtained from MOG-immunized C57BL6/J mice at the peak of clinical score (≥ 3), as described previously [24, 26] and were plated in IMDM (BioWest, Nuaillé, France), supplemented with 2-mM L-glutamine, 1% P/S, 10% FBS (Gibco), and 50-μM β-mercaptoethanol, in U-bottom 96-well plates at a density of 2×10^5 cells. Splenocytes were exposed to 2-μM Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye (Biolegend) diluted in PBS supplemented with 0.1% BSA at 37 °C with shaking for 20 min, protected from light. After washing, splenocytes were stimulated for 72 h with 5 μg/mL MOG and treated with 2 μg/mL tPA, 5 μM AG1478 or the combination of both. Cells were harvested by centrifugation at 2000 rpm at RT, washed in PBS and stained for the flow cytometry assay.

In order to analyze the direct effect of tPA on MHC-II upregulation and on T cell proliferation, splenocytes from EAE mice at the peak of their clinical symptoms were depleted of CD3 T cells by cell sorting in a FACS Aria IIu. These splenocytes were plated at 2×10^5 cells per well in U-bottom 96-well plates with and were exposed to MOG or MOG + tPA. After 24 h, the medium was replenished in all culture conditions, and 5×10^4 sorted Tag-it Violet-labelled $CD3^+$ T cells from other EAE mice at the peak of their clinical symptoms were added to each well. In one of the culture conditions, tPA was removed to check the direct effect of the protease on antigen presentation capacity. After 72 h, cells were harvested, and CD3, CD4, and CD8 proliferative cells were counted in a FACS Canto II cytometer.

The proliferation index has been calculated dividing the sum of the cells in all generations by the computed number of original parent cells, which were theoretically present at the beginning of the experiment. Analysis of data was performed using the ModFit LT™ software (Verity Software House).

Flow cytometry

Cells were resuspended in 50 μl of staining buffer, and Fc receptors were blocked for 15 min at 4 °C with 10 μg/mL anti-CD16/CD32 antibodies (BD Biosciences.) After the blocking step, cells were labelled for 20 min at 4 °C with corresponding fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (Suppl. Table 1). The BD Pharmingen transcription factor buffer set was used according to the manufacturer's protocol to detect expression of FoxP3. When necessary, cells were fixed in a final volume of 300 μl with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min. For detection of intracellular cytokines, splenocytes were stimulated for 5 h with 500 ng/mL PMA (Sigma-Aldrich) and 500 ng/mL ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of 10 μg/ml brefeldin A (Biolegend). Then, cells were fixed and permeabilized with cyto Fix/Perm (Biolegend) and stained at RT for 30 min. Samples were acquired on a FACS Verse or a FACS Canto II cytometer (Beckton Dickinson), and data were analyzed with the FlowJo 7.6.5 software (TreeStar Inc.). Cell frequencies were determined by flow cytometry and absolute numbers calculated from counts determined using a hemocytometer (Malassez chamber).

Cytokine assay

Levels of cytokines in supernatants of anti-CD3/CD28 stimulated splenocytes were determined using the cytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Measurements were performed using FACS Verse flow cytometer, and data were analysed with the FCAP Array™ software (version 3.0).

Immunofluorescence

Mice at the EAE plateau phase (d20 ± 3) and with matching mean scores were deeply anesthetized and transcardially perfused with 50 mL of cold 1X PBS. Tissue samples were postfixed for 24 h at 4 °C with 4% PFA and then cryoprotected for 24 h at 4 °C with 20% sucrose solution, before freezing process into Tissue-Tek (Miles Scientific). Samples were then cut with a cryomicrotome (Leica) to obtain 10-μm sections which were thaw-mounted on polylysine-coated slides and stored at − 80 °C before experiment. After warming, sections were rehydrated three times in PBS during 15 min and incubated overnight at RT with the following antibodies: rabbit anti-CD3 (1:200, Abcam ab5690), rat anti-CD4 (1:25, eBiosciences 14-0042-82, clone RM4-5), and goat anti-colIV (1:1000, Southern Biotech 1340). Primary antibodies were revealed by using affinipure F(ab')2 fragments of donkey IgGs conjugated to Alexa 647, Alexa 488 or Cy3 (1:1000, Jackson Immuno Research). Then, sections were washed in PBS and coverslipped with antifading medium containing DAPI. Images were digitally captured on Leica DM6000 microscope-coupled coolsnap camera, visualized with Metavue 5.0 software (Molecular Devices, USA) and further processed using ImageJ 1.49e software (NIH). For cell counting, images of three WT and three $tPA^{-/-}$ hemi-spinal cord sections from cervical, upper thoracic, lower thoracic, and lumbar/sacral regions were analyzed with the Fiji (ImageJ) software: an image-by-image threshold was applied to obtain a binary image for automatic particle counting (cells/mm^2) using a minimal particle size assigned to overcome the background noise of the image.

Statistical analysis

Results are presented as the mean + SEM and were analysed with the GraphPad Prism and SigmaPlot 11.0 softwares. Normality tests were performed on all samples (Agostino-Pearson omnibus and Shapiro–Wilk tests).

Nonparametric Kruskal–Wallis for multiple comparisons were used, followed by two-by-two comparisons by Mann–Whitney's U tests when relevant. For multiple comparisons, an ANOVA test or its corresponding ANOVA on RANKS was performed followed by the Tukey or Dunn post hoc tests (compared with the control condition or all pairwise), respectively. The minimum value of statistical significance considered was $P < 0.05$; for comparison of incidence curves, log-rank (Mantel-cox test) was used.

Results

EAE is less severe in tPA-deficient mice

tPA$^{-/-}$ mice developed less severe EAE disease than their WT counterparts (control group), with lower clinical scores during the plateau phase between dpi 17 and 23 (d20 ± 3) (Fig. 1a). Although no significant difference was observed between tPA$^{-/-}$ and WT mice in the incidence of the disease ($P = 0.1194$, Fig. 1b) nor for the day of disease onset (tPA$^{-/-}$ 15.13 ± 0.88 *vs* WT 14.6 ± 0.45, $P = 0.8159$, data not shown), peak score and cumulative clinical score were significantly lower in tPA$^{-/-}$ than in WT mice (tPA$^{-/-}$ peak score 1.16 ± 0.23 *vs* WT 2.07 ± 0.29, $P = 0.0164$; cumulative clinical score 10.17 ± 2.89 *vs* 20.38 ± 3.76, $P = 0.0163$, Fig. 1c and d). In addition, severity index ([26]), was significantly lower in tPA$^{-/-}$ than in WT mice (tPA$^{-/-}$ severity index 0.3440 ± 0.08 *vs* WT 0.6652 ± 0.10, $P = 0.0075$, Fig 1e).

tPA enhances T cell response by a proteolytic mechanism

Given that immune cell infiltration is a cardinal feature of EAE, we analyzed T cell subpopulations in the spinal cords of EAE mice during the plateau phase of the disease (d20 ± 3) by flow cytometry (Fig. 2 and Suppl. Fig. 1) and immunofluorescence (Suppl. Fig 2). We found that the absolute number of CD4$^+$ T cells was lower in tPA$^{-/-}$ than in WT mice (6940 ± 1220 *vs* 27,110 ± 3642 cells; $P = 0.0238$, Suppl. Fig 1B, Fig. 2a), an observation consistent with the clinical scores observed in tPA$^{-/-}$ EAE mice (Fig. 1). Neither CD8$^+$ (WT 61,291 ± 11,070 cells *vs* tPA$^{-/-}$ 42,721 ± 4988 cells, $P = 0.5476$, Fig. 2b) nor regulatory FoxP3$^+$ T cell (T_{reg}) (WT 2396 ± 2322 cells *vs* tPA$^{-/-}$ 394.6 ± 444 cells; $P = 0.1667$, Fig. 2c) were significantly altered. In accordance with the above data, CD4$^+$ T cells were the only CD3$^+$ T cell subset that showed changes in the spinal cord of tPA$^{-/-}$ mice (tPA$^{-/-}$ 13.87% ± 2.44 *vs* WT 29.85% ± 4.01, $P = 0.0476$, Fig. 2d). Concordantly, the histological analysis of the spinal cords (Fig. 2e) further showed that the average density of CD4$^+$ T cells within infiltrated area was lower in tPA$^{-/-}$ than in WT EAE mice (absolute number of WT 514.4 ± 135.7 *vs* tPA$^{-/-}$ 245.3 ± 50.78, $P = 0.0495$, Fig. 2g and Suppl. Fig. 2A-C) and that these changes were mainly due to differences in the cervical region (WT 51.33 ± 13.49 vs tPA$^{-/-}$ 9.97 ± 1.98, $P = 0.0495$, Fig. 2h). Interestingly, when analyzing the cytokine profile of CD4$^+$ T cells *in vivo*, we showed that the percentage of IFN-γ/CD4$^+$ T cells—but not IL-17/CD4$^+$ T cells—was significantly decreased in tPA$^{-/-}$ EAE mice as compared with WT EAE (IFN-γ/CD4$^+$ T cells WT 9.4% ± 4 vs. tPA$^{-/-}$ 2.8% ± 0.8, $P = 0.011$; IL-17/CD4$^+$ T cells WT 4% ± 2.3 vs. tPA$^{-/-}$ 2% ± 0.6, $P = 0.3$; Fig. 2i and j, Suppl. Fig 1C).

To determine the mechanisms involved in the decrease of CD4$^+$ T cell number in tPA$^{-/-}$ EAE mice, we assessed their functional response *in vitro* after

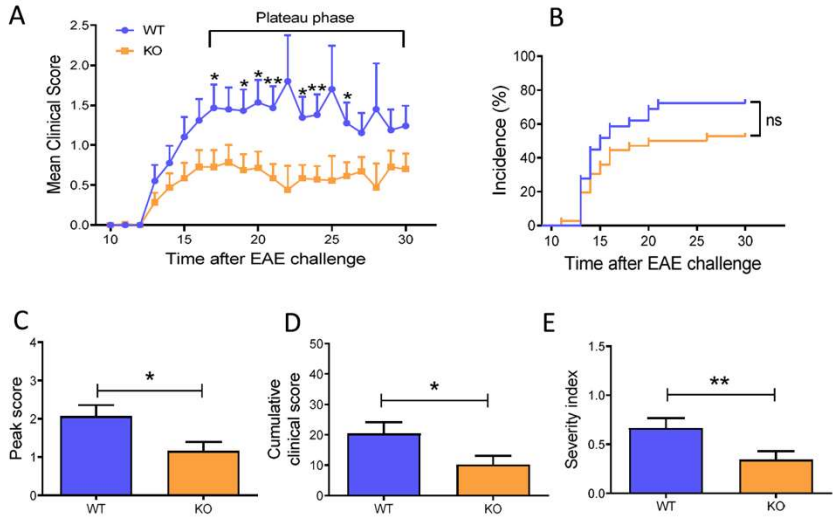


Fig. 1 tPA$^{-/-}$ mice show less EAE symptoms than WT mice. **a** Mean EAE clinical score, **b** incidence, **c** peak score, **d** cumulative clinical score, and **e** severity index for WT and tPA$^{-/-}$ mice. Results are expressed as mean + SEM. $N = 29$ (WT) and $N = 35$ (tPA$^{-/-}$). $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$

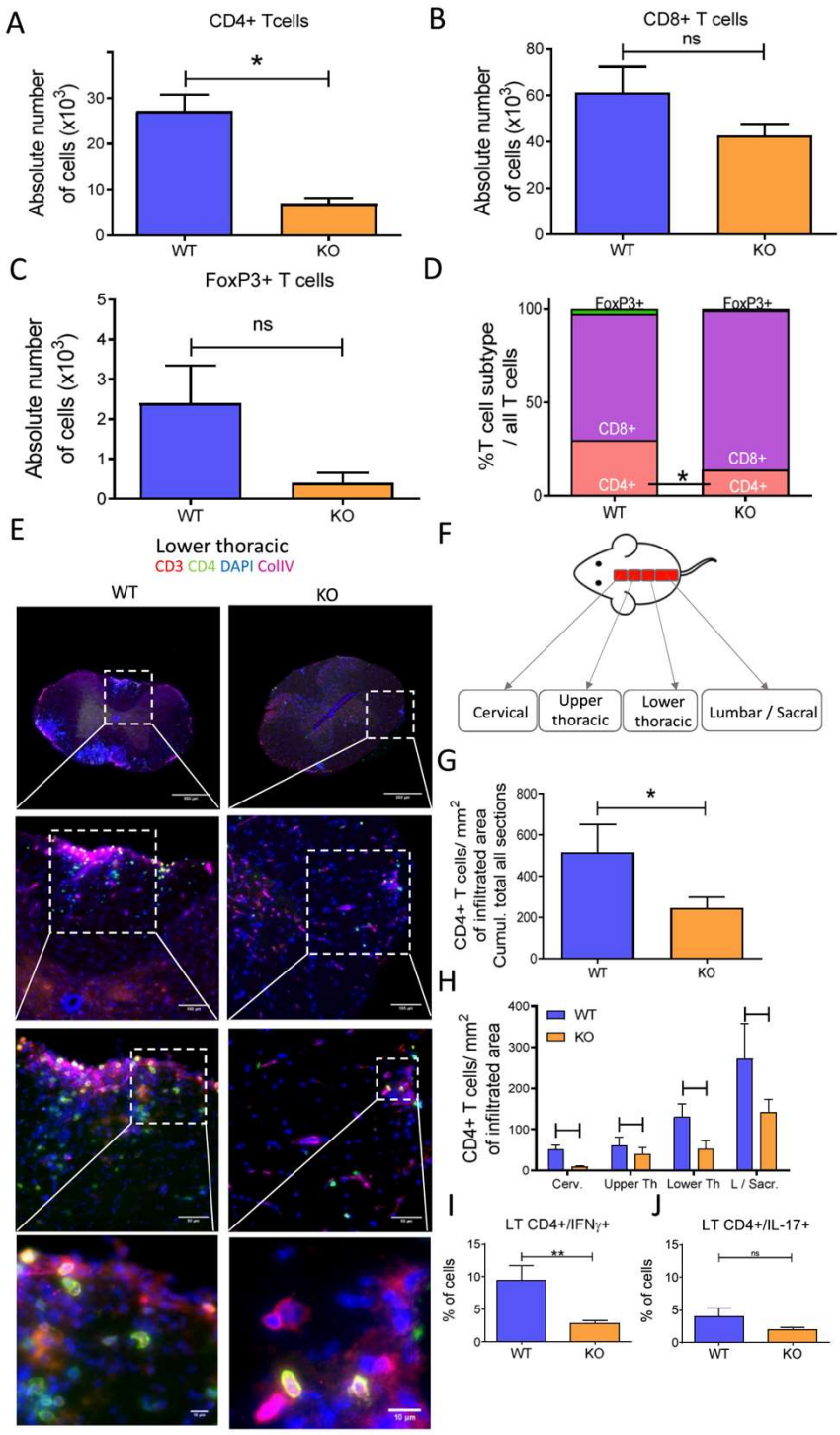


Fig. 2 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 2 tPA$^{-/-}$ mice show reduced CD4$^+$ T cell infiltration than WT in the spinal cord. Absolute number of infiltrated **a** CD4$^+$, **b** CD8$^+$, and **c** FoxP3$^+$ T cells in spinal cords of WT and tPA$^{-/-}$ EAE mice measured by Malassez cell counting and flow cytometry. Results are expressed as mean + SEM. $N = 6$ (WT) and $N = 3$ (tPA$^{-/-}$). $^*P < 0.05$. **d** Percentages of T cell subtypes relative to total CD3$^+$ T cell number in the spinal cord of tPA$^{-/-}$ and WT EAE mice. **e** Photomicrographs show representative immunofluorescence staining (from $N = 3$ for tPA$^{-/-}$and WT) for CD3, CD4, and COLIV markers in the lower thoracic region of mice spinal cords. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). **f** Scheme describing the different parts of the spinal cord. **g** and **h** Quantification of the average density of CD4$^+$ T cells within infiltrated areas in **g** the whole spinal cord and in **h** individual segments (*Cerv.* cervical, *Upper Th.* upper thoracic, *Lower Th.* lower thoracic, *L/Sacr.* lumbar/sacral. ($N = 3$). $^*P < 0.05$. **i** and **j** Intracytoplasmic cytokine detection by flow cytometry in splenocytes from tPA$^{-/-}$ and WT EAE mice (10 days post-immunization) after stimulation with PMA/ionomycin. Graphs show the percentage of CD4$^+$/IFN-γ$^+$ T cells and CD4$^+$/IL-17$^+$ T cells. $N = 7$ (WT) and $N = 7$ (tPA$^{-/-}$). $^{**}P < 0.01$

activation with anti-CD3ε/CD28. CD4$^+$ T cells from tPA$^{-/-}$ naive mice proliferated less than CD4$^+$ T cells from their WT counterparts (proliferation index: tPA$^{-/-}$ 2.03 ± 0.43 *vs* WT 6.18 ± 1.38; $P = 0.0317$; Fig. 3a and b). Activation level measured by mean fluorescence intensity (MFI) of CD25 was also reduced in CD4$^+$ T cells from tPA$^{-/-}$ as compared with WT CD4$^+$ T cells (51.42% ± 10.96 of WT; $P = 0.0286$, Fig. 3d). Importantly, the addition of exogenous tPA rescued the proliferation and activation of tPA$^{-/-}$ CD4$^+$ T cells at the same level as CD4$^+$ T cells from WT counterparts ($P = 0.8413$ and $P = 0.3143$, respectively; Fig. 3a, b, and d). As in the case of the *in vivo* analysis, CD8$^+$ T cell proliferation was not affected in tPA$^{-/-}$ (proliferation index 11.65 ± 4.93 *vs* tPA$^{-/-}$ 6.57 ± 3.35, $P = 0.3095$) although their activation was reduced (59.34% ± 14.48 of WT, $P = 0.0286$; Fig. 3a, c and e).

We next examined the effect of tPA on T cell response *in vitro*. tPA significantly increased proliferation and activation of anti-CD3ε/CD28 activated CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells in a dose-dependent manner, in comparison with the control group of untreated cells (Fig. 4a-e). At the dose of 10 μg/mL of tPA, proliferation of CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells were increased to reach 163.40% ± 11.28 ($P = 0.0004$) and 170.90% ± 12.59 ($P = 0.0012$), respectively. No effect of tPA was observed on T_{reg} cells ($P = 0.9999$, Fig. 4f). In order to further analyze the profile of CD4$^+$ T cells involved in the response to tPA treatment, we analyzed by flow cytometry the expression of CCR6 and CXCR3, two chemokine receptors involved in the CNS trafficking of Th17 and Th1 cells, respectively. We observed an increase in the percentage of CCR6$^+$/CD4$^+$ T cells, with no changes in the percentage of CXCR3$^+$/CD4$^+$ T cells after treatment of splenocytes with tPA (10 μg/mL) for 72 h (Fig. 4g).

Next, we investigated the mechanisms underlying tPA actions on T cells. Since the primary action of tPA is to activate plasminogen into plasmin, we interrogated the different elements of the tPA/plasminogen/plasmin cascade. Plasminogen treatment neither increased CD4$^+$ T cell proliferation nor potentiated the proliferative action of tPA on CD4$^+$ T cells ($P = 0.400$ and $P = 0.200$; Fig. 4h). However, aprotinin, a specific inhibitor of plasmin, did reverse tPA-mediated activation (for CD4$^+$ T cells, $P = 0.0190$; for CD8$^+$, $P = 0.0109$; Fig. 4i and j). In addition, the inactivation of the catalytic activity of tPA (tPA-GGACK) abolished tPA stimulatory effect on CD4$^+$ and CD8$^+$ T cell proliferation ($P = 0.0252$ and 0.0162, respectively; Fig. 4i and j). In addition, ε-ACA, an inhibitor of plasmin generation from plasminogen inhibited the stimulatory effect of tPA on CD4$^+$ and CD8$^+$ T cell proliferation ($P = 0.0056$ and $P = 0.0040$, respectively; Fig. 4i and j). This indicates that tPA increases T cell proliferation *via* the proteolytic activation of plasminogen into plasmin.

We next explored if tPA-mediated effects on T cell proliferation was related to its previously demonstrated proteolytic action on NMDAR [27], as this receptor was previously reported to be expressed on T cells [28, 29]. Glunomab®, a monoclonal antibody that blocks the interaction between tPA and NMDAR [19], did not alter the proliferative effect of tPA on CD4$^+$ T cells (Supplementary Fig. 3). This result excluded that tPA may act on T cell proliferation by acting on NMDAR.

Furthermore, since cytokines are key mediators of T cell-driven autoimmunity, we analyzed the impact of tPA on the late cytokine pattern of activated T cells. tPA-induced an increase of IL-6 and IL-10 secretion by activated splenocytes at 4 days of culture (respectively 233.9% ± 47.45, $P = 0.0289$ and 499.4% ± 184.3, $P = 0.0029$, Fig. 4k). In addition, concerning IL-6, this effect was not observed with tPA-GGACK and was inhibited in the presence of ε-ACA or aprotinin ($P = 0.0167$, 0.0167, and 0.0333, respectively, Fig. 4l). ε-ACA also reverted the activation of IL-10 secretion by tPA ($P = 0.0167$, Fig. 4m). Together, these data indicate that tPA increases T cell proliferation *via* the generation of plasmin to increase their proliferation, activation, and secretion of cytokines.

tPA enhances myeloid cell maturation by the activation of EGFR

Our next step was to analyze whether the distribution of myeloid cells is altered in the spinal cord of tPA$^{-/-}$ EAE mice. We found that absolute numbers of CD11c$^+$/CD11b$^+$ (dendritic cells, DCs) and CD45^{high}/CD11c$^-$/CD11b^{high} (activated microglia and infiltrated macrophages, M) were lower in the spinal cords of tPA$^{-/-}$

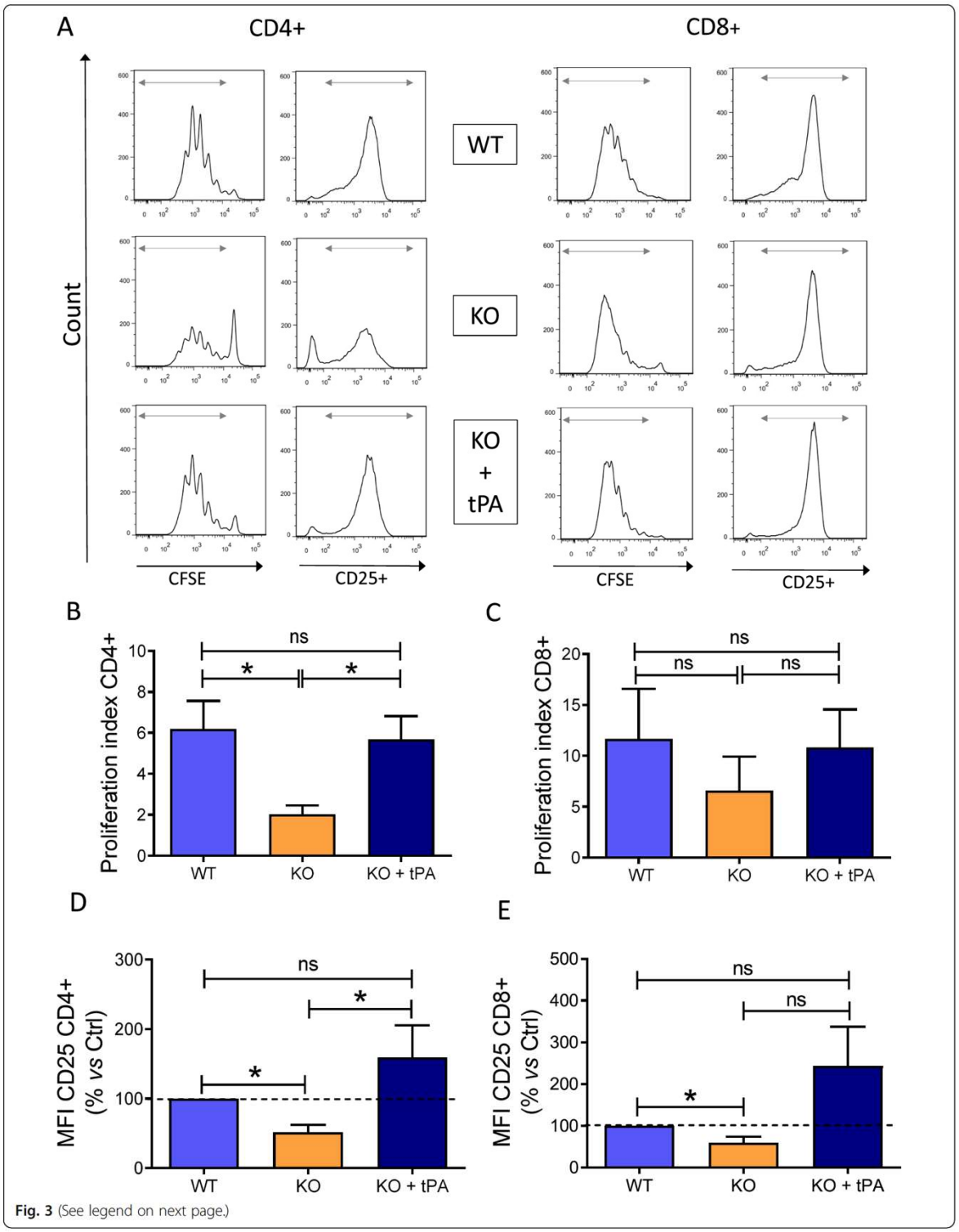


Fig. 3 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 3 Endogenous tPA stimulates CD4$^+$ T cell proliferation and activation. tPA$^{-/-}$ and WT splenocytes were activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (both 1 μg/mL) and treated in the indicated conditions for 4 days. **a** Representative flow cytometry histograms for proliferation (CFSE) and activation (CD25$^+$) of T cells. Corresponding quantification of proliferation index for **b** CD4$^+$and **c** CD8$^+$ T cells. Percentage of increase of CD25 for **d** CD4$^+$ and **e** CD8$^+$ T cells. Results are expressed as mean + SEM (N = 5). $^*P < 0.05$

EAE mice as compared with their WT EAE counterparts (DCs 15,474 ± 2984 *vs* 72,283 ± 8330; P = 0.0238; microglia/M : 14,980 ± 5442 *vs* 119,228 ± 16,810, P = 0.0238; Suppl. Fig 4, Fig. 5a and b).

We then analyzed whether tPA may affect the proportion and the phenotype of DCs and M (Fig. 6, Suppl. Fig. 5). First, splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were treated with different concentrations of exogenous tPA (0.2, 2, and 20 μg/mL) during 24 h. None of the tPA concentrations modified the percentage of antigen presenting DCs (CD11c$^+$MHC-II$^+$) and M (F4/80$^+$ MHC-II$^+$) populations (Fig. 6a and b). However, tPA (2 μg/mL) induced a significant increase of MHC-II$^+$ MFI in both cell populations compared to control conditions (DCs 120.75% ± 3.92; M 121.69% ± 4.72, P < 0.001, Fig. 6c and d). Splenic APCs modify their immunophenotype along the clinical course of EAE. The number of APCs with a more immunogenic profile (i.e., MHC-II$^+$ CD80$^+$ CD86$^+$ CD40$^+$ cells) increased along the clinical course of the disease, being maximum at the peak. In parallel, the number of APCs with a more tolerogenic immunophenotype (i.e., MHC-II$^+$ CD80$^-$ CD86$^-$ PD-L1$^+$ cells) decreased, being minimum at the peak and remained very high in asymptomatic EAE mice (suppl. Fig. 6). Interestingly, tPA (2 μg/mL) promoted the polarization on the MHC-II$^+$ expressing antigen-presenting cell (APC) subsets towards a more pro-inflammatory and immunogenic phenotype, with a significant increase in the percentage of MHC-II$^+$ CD80$^+$ CD86$^+$-APCs (DCs 122.45 ± 6.22, P = 0.002; M 128.04 ± 5.70; P = 0.004, Fig. 6e and f) and a decrease in the percentage of MHC-II$^+$ CD80$^-$ CD86$^-$ tolerogenic APCs (DCs 87.09% ± 3.20, M 86.71% ± 2.70; P = 0.005 and P < 0.001, respectively; Fig. 6g and h).

Then, we aimed at analyzing the receptors and/or tPA functional domains enrolled in APC maturation. Treatment of APCs with catalytically inactive tPA (tPA-GGACK) did not modify MHC-II$^+$ expression, although the difference with native tPA was not significant (tPA: DCs 121.12% ± 4.211, M 113.96% ± 4.406; P = 0.040 and P = 0,042, respectively, *versus* control condition; tPA GGACK: DCs 108.30% ± 4.166; M 105.21% ± 4.647, with respectively P = 0.156 and P = 0.440 *versus* control condition and P = 0.072; P = 0.186 versus tPA; Fig. 7a and b). Nonetheless, none of the tPA-mediated effects on APC polarization were modified by the addition of Glunomab® (Suppl. Fig. 7). These data indicate that the action of tPA on APCs is not mediated *via* interaction with NMDAR.

On the other hand, it has been shown that tPA can act via non-proteolytic "growth factor-like" effects [30], some of them mediated by its EGF-like domain [4, 15]. The addition of the EGFR blocking agent AG1478 decreased MHC-II$^+$ expression on MHC-II$^+$ APCs as compared with the condition with tPA (DCs 55.49% ± 6.525; M 77.76% ± 2.249; P < 0.001, Fig. 7c and d). These data indicate that tPA promotes APC maturation partly by the activation of EGFR.

tPA-mediated APC polarization is accompanied by a higher MOG-specific T cell response

In order to determine whether the stimulatory effect of tPA on APC maturation may modify T cell functions, splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were cultured in the presence/absence of tPA, with or without *ex vivo* reactivation with MOG. In the absence of MOG reactivation, tPA by itself did not induce CD4$^+$ or CD8$^+$ T cell proliferation (CD4$^+$ 107.22% ± 10.94; CD8$^+$ 124.73% ± 57.01 data not shown). Condition with MOG reactivation showed a higher percentage of proliferation than control conditions for both CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells (CD4$^+$ 852.79% ± 125.03; CD8$^+$ 1525.90% ± 261.96, both P < 0.05, data not shown). Interestingly, tPA potentiated MOG-induced CD4$^+$ T cell proliferation (132.43% ± 6.28; P < 0.05, Fig. 7e). In line with the previous results about APC maturation, the stimulatory effect of tPA on MOG-activated CD4$^+$T cell proliferation was abrogated when EGFR activity was blocked by AG1478 (81.88% ± 14.25; P < 0.05, Fig. 7e), while AG1478 did not modify MOG-induced APC proliferation in the absence of tPA (Fig. 7e). Remarkably, the stimulatory effect of tPA was not observed in MOG-activated CD8$^+$ T cells (108.26% ± 5.45; P > 0.05, Fig. 7f), in accordance with what was observed in the context of CD3/CD28 polyclonal activation of CD8$^+$ T cells extracted from tPA$^{-/-}$ mice (Fig. 3c).

Finally, to assess whether tPA can act directly on APCs, CD3 T cell-depleted splenocytes isolated from EAE mice at the peak of the clinical course were stimulated by MOG peptide in the presence/absence of tPA. After 24 h, Tag-it Violet-labelled sorted CD3 T cells from the spleen of EAE mice at the peak of the clinical course were added, and the medium was replenished in all culture conditions. In one experimental condition, tPA was removed at 24 h to check the specific effect of

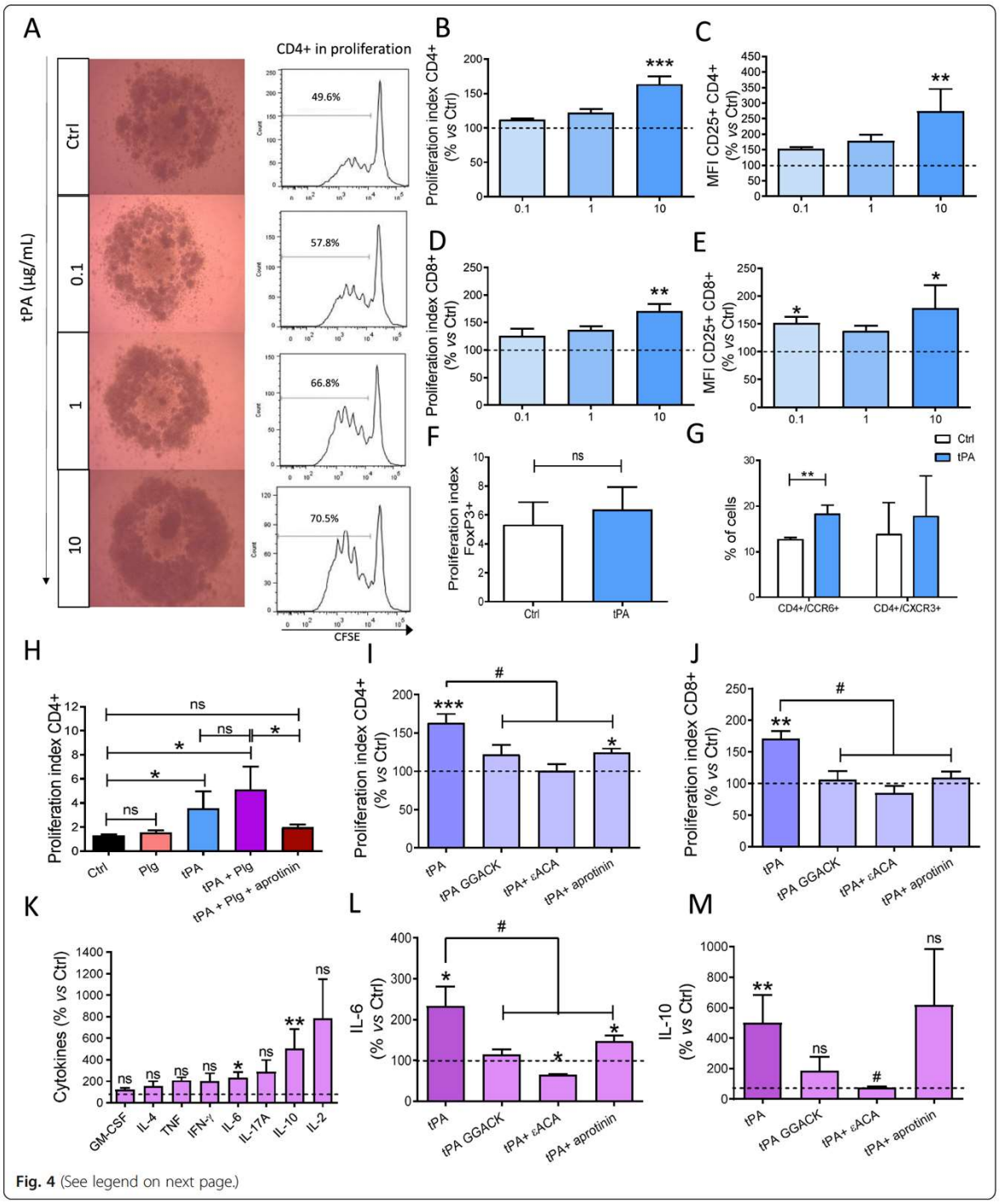


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Fig. 4 tPA activates CD4$^+$ and CD8$^+$, but not FoxP3$^+$ T cells *in vitro* by a proteolytic mechanism. Splenocytes from naive mice were activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (both 1 μg/m) and treated in the indicated conditions for 4 days. **a** Proliferation estimated by observation under bright field binocular (left) and representative flow cytometry histograms for CFSE fluorescence (right), indicating the number of cells in proliferation state at the time of the experiment. Quantification of proliferation index (CFSE) and CD25$^+$ MFI (as index of activation) for **b, c** CD4$^+$ and **d, e** CD8$^+$ (N = 4–9). **f** Quantification of proliferation index for FoxP3$^+$ T cells (N = 3). Proliferation index are expressed as mean + SEM percentage *vs* control (Ctrl = 100% baseline). Activation is expressed as mean + SEM percentage of increase of CD25 MFI. **g** Quantification of CD4$^+$/CCR6$^+$ T and CD4$^+$/CXCR3$^+$ T cells (N = 4). **b–g** $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control. **h–j** Proliferation index of CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells in the indicated treatment conditions. N = 5–9; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control; $^{\#}P < 0.05$ *vs* tPA. **k, l** Cytokine measurements (percentage of control) in activated splenocytes treated in the indicated conditions (N = 4–7). $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* control; $^{\#}P < 0.05$ *vs* tPA

tPA over CD3 T cell-depleted splenocytes. Our data showed that tPA pretreatment of CD3 T cell-depleted splenocytes during the first 24 h increased their ability to potentiate CD4 T cell proliferation (MOG + tPA 24 h: 132.47% ± 3.52; $P < 0.05$ versus MOG, Fig. 7g). Interestingly, the presence of tPA during the whole experiment did not induce an additional proliferative effect on CD4 T cells (MOG + tPA 96 h: 136.81% ± 6.22; $P < 0.05$ versus MOG, Fig. 7g). On the other hand, tPA did not exert any significant effect on CD8 T cells (MOG + tPA 24 h: 92.55% ± 5.14; MOG + tPA 96 h: 81.55% ± 6.25, Fig. 7h). These results indicate that tPA can act directly on APC maturation during the first 24 h of exposition to potentiate MOG-activated CD4 T cell proliferation.

In sum, our data indicated that the direct and early effect of tPA on APC maturation and pro-inflammatory polarization resulted in amplified MOG-induced CD4$^+$ T cell response. This effect may explain the deleterious role of tPA in EAE.

Discussion

Previous works reported that tPA expression is increased in the CNS during EAE [11, 31], a result which suggests an involvement of this serine protease in the EAE physiopathology. Although tPA has been reported to induce neurotoxic effects [32], these effects are unlikely to play a significant part in the processes reported here. In fact, genetically induced upregulation of tPA expression in neurons does not impact the score of EAE [31]. Furthermore, the motor symptoms observed in EAE correlate with both demyelination [33] and axonal injury [34] but not with neuronal death, which is hardly detectable in the spinal cord of MOG-induced EAE until late stages [35]. Thus, the pathophysiology of EAE and the timing of the effects observed in this work, where differences between tPA$^{-/-}$ and WT mice occur at early symptomatic stages, also argue against a significant implication of neuronal death.

Indeed, our study reports a deleterious role of tPA in EAE by an action on lymphoid and myeloid cell subsets by two complementary mechanisms: on the one hand, tPA directly increases T cell activation, proliferation and IL-6 secretion in a plasmin-dependent manner. On the other hand, tPA indirectly increases T cell proliferation by increasing the expression of MHC-II and co-stimulatory molecules in DCs and M , by both proteolytic and growth factor-like effects. These elements may bring an explanation to the deleterious effect of endogenous tPA observed here in EAE and put forward complementary mechanisms of tPA in immune response.

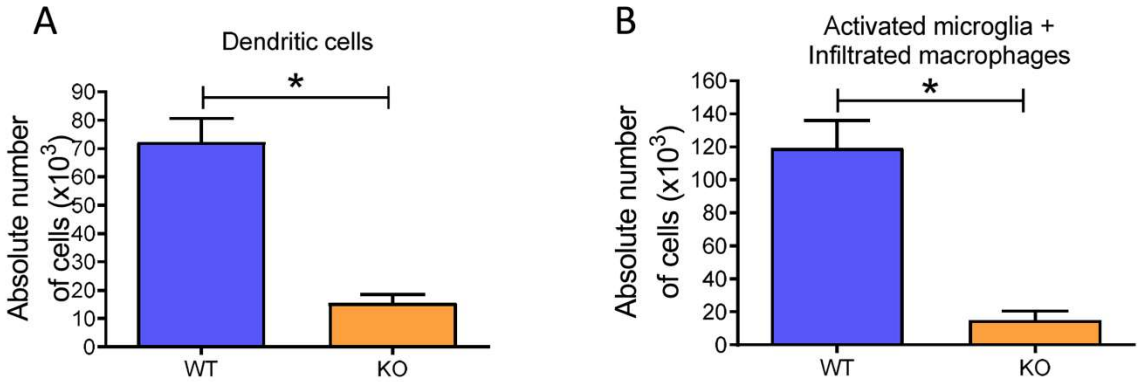


Fig. 5 tPA$^{-/-}$ mice show reduced myeloid cell infiltration than WT in the spinal cord. Absolute number of infiltrated **a** DCs and **b** Mϕ$^+$ activated microglia in half-spinal cords of WT and KO EAE mice measured by Malassez cell counting and flow cytometry. Results are expressed as mean + SEM [N = 6 (WT) and N = 3 (tPA$^{-/-}$)]. $^*P < 0.05$

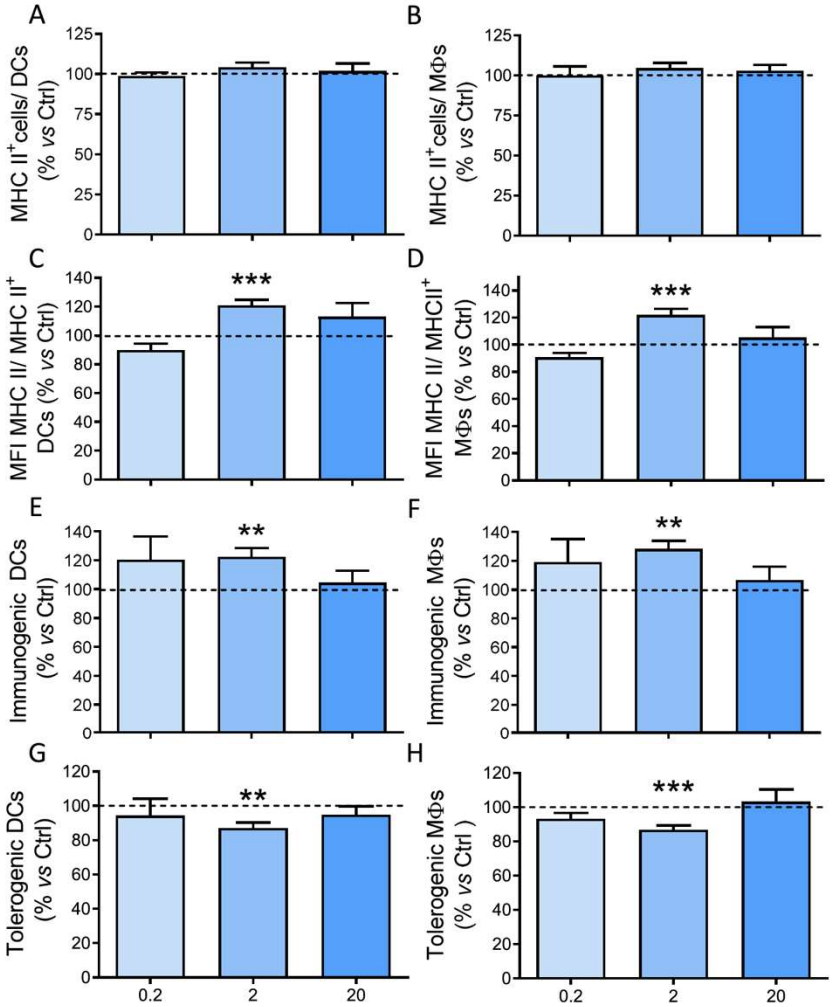


Fig. 6 tPA polarizes splenic APCs from EAE mice towards a pro-inflammatory phenotype. Splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were treated in the indicated conditions. **a, b** Percentage of **a** CD11c$^+$MHC-II$^+$-DCs and **b** F4/80$^+$ MHC-II$^+$-Mϕ in each APC subpopulation. **c, d** MFI of MHC-II in APCs, **e–h** Percentage of **e, f** MHC-II$^+$ CD80$^+$ CD86$^+$ immunogenic and **g, h** and MHC-II$^+$ CD80$^-$ CD86$^-$ tolerogenic APCs in the presence of different tPA concentrations. In all cases, tPA at the concentrations of 0.2 and 20 μg/mL showed no differences. Results are expressed as mean + SEM ($N = 5$), $^*P < 0.05$

Previous data from the literature are contradictory about the role of tPA in neuroinflammation in EAE. Some reports indicate that tPA$^{-/-}$ mice present earlier and more severe disease than their WT counterparts, suggesting a protective role of tPA [12, 13, 36]. Other studies using tPA$^{-/-}$ mice, including the present one, argue for a deleterious effect of tPA [11]. These discrepancies could be explained by different experimental conditions, including different MOG doses, the use of MOG re-boost or differences in the age of mice, but also in environmental conditions [37]. These different conditions determine different EAE severity profiles between laboratories, in which the beneficial and deleterious effects of tPA [38] may then express themselves differently. Nevertheless, repeated administration of tPA worsened the clinical scores of EAE and slightly anticipated its onset [39], which supports an adverse effect of tPA in this model. Moreover, our data showing that tPA enhances IFN-γ, a cytokine with encephalitogenic properties, are also in favor of a deleterious role of tPA in EAE.

The fact that tPA promotes T cell activation and proliferation is in agreement with recently published data [36]. The present study provides further elements by demonstrating that this effect is dependent of plasminogen activation into plasmin. However, the potential mechanisms downstream of plasmin activation that may

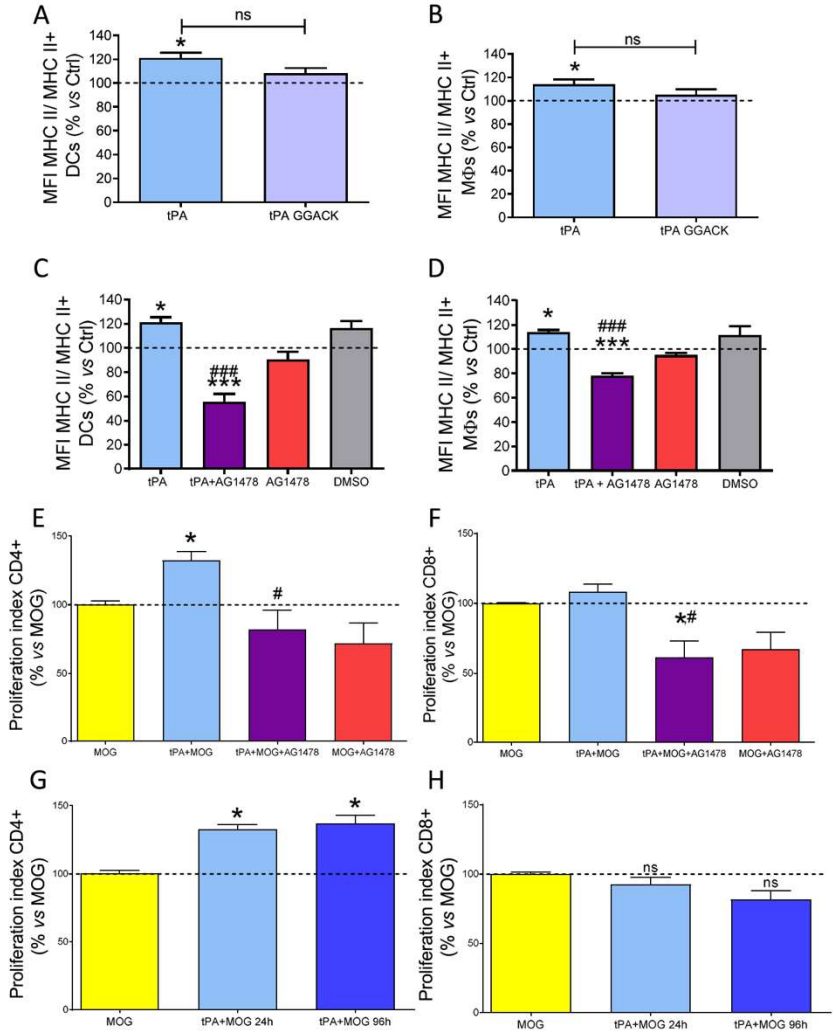


Fig. 7 tPA stimulates MOG_{35-55}-dependent APC maturation and T cell proliferation *via* its EGF-like domain. Splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were treated in the indicated conditions. **a, b** MHC-II MFI in **a** $CD11c^+$MHC-II^+-DCs and **b** $F4/80^+$ MHC-II^+-MΦs exposed to 2 μg/mL of tPA or 2 μg/mL of tPA-GGACK. **c, d** Expression of MHC-II MFI in **c** $CD11c^+$MHC-II^+-DCs and **d** $F4/80^+$ MHC-II^+-MΦs after combined treatment with 2 μg/mL of tPA and 5-μM EGFR inhibitor AG1478. **e, f** Cell proliferation index of **e** $CD4^+$ and **f** $CD8^+$ T cells after combined treatment with 5 μg/mL MOG_{35-55}, 2 μg/mL of tPA and 5-μM EGFR inhibitor AG1478. $N = 6–7$ and $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* control; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* tPA. **g, h** Cell proliferation index of sorted **g** $CD4^+$ and **h** $CD8^+$ T cells in co-culture with MOG-stimulated CD3 T cell-depleted splenocytes with/without 2 μg/mL of tPA during 24 or 96 h ($N = 6–7$ for **a–f**, $N = 3$ for **g** and **h**, and $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* baseline; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* tPA)

act on T cells in the context of EAE remain elusive. At least three potential candidates can be cited. First, tPA induces the release of the pro-form of matrix metalloproteinase 9 (pro-MMP9) from endothelial cells by activating the lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) receptor [40] and activates pro-MMP9 into its active form, MMP9 *via* plasminogen activation [41]. Remarkably, MMP9 is involved in T cell proliferation, as MMP9-deficient T cells display altered proliferative ability [42]. Second, tPA activates heparin-bound EGF into free EGF, *via* the action of plasmin and matrix MMP9, leading to EGFR signalling in different cell types [43]. Third, plasmin is able to raise the bioavailability of the chemokine CCL21, known to regulate the homing of T cells and DCs towards lymphoid organs [44] and to act as a co-stimulatory molecule to promote T cell expansion and Th1 differentiation [45]. Interestingly, EGFR inhibition induces $CD4^+$ T cell anergy *in vitro* and

in vivo [46]. Further experiments may clarify whether MMP9, EGFR, and/or CCL21 participate in the mechanisms by which tPA promotes T cell proliferation and activation.

Our data emphasize plasmin-dependent immune functions of tPA in EAE. In accordance with our results, plasminogen deficiency in mice delays the onset and protects from demyelination in EAE [47]. Furthermore, plasmin is able to activate microglia [48], suggesting that tPA/plasmin axis is an important component to consider in future studies on the biological mechanisms underlying EAE.

Our data show that tPA acts also on myeloid cells by a distinct mechanism involving EGFR activation. By this action, tPA increases the expression of MHC-II and the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 by DCs and M , leading to a polarization from a tolerogenic to an immunogenic activity state. Our data did not allow to firmly conclude on a possible implication of the proteolytic activity of tPA in these effects. This possibility should be more thoroughly addressed in further studies.

Our results were in contrast with a previous study reporting that tPA reduces macrophage response to LPS by inhibiting ERK pathway and cytokine production, an effect mediated *via* the combined action of NMDAR and LRP pathways [20]. The mechanisms implied are likely to be different from what described in the present work: the increase in antigen-presenting capacity of APCs, induced by tPA, is not prevented by Glunomab®, which points to the involvement of another pathway. In fact, in our co-culture system, the CD4 T cell proliferative effect of tPA on APC is reversed by EGFR inhibition, which indicates that tPA-mediated effects on antigen presentation are exerted *via* EGFR activation. The direct EGFR-mediated effect on T cell proliferation cannot be totally discarded in light of our observations. Nevertheless, pretreatment of T cell-depleted splenocytes with tPA is sufficient to potentiate the proliferation of T cells added subsequently to the co-culture (Fig. 7g and h). This indicates that tPA-mediated effects on antigen presentation are directly exerted via EGFR and essentially mediated via an action on APCs. Our study is the first that correlates the expression of MHC-II molecules with the activation of EGFR by tPA. However, the downregulation of MHC-II expression by AG1478 in the absence of tPA may indicate that EGFR is intrinsically involved in antigen presentation. Interestingly, EGFR downstream signalling inhibition is a promising strategy in diverse tumor types by inducing MHC-II in APCs and breaking down tolerance [49]. Our data reinforces the idea of targeting EGFR activity as an interesting target to modulate MHC-II expression, either to potentiate it, as in the case of cancer, or to reduce it, as in the case of MS or other autoimmune diseases in which tolerance induction is one of the golden aims in cell therapy-based strategies [50].

These data show that tPA can act on the myeloid population by mechanisms independent of plasmin generation and complete previous reports showing that tPA can activate microglial cells *via* its finger domain through annexin II [30]. In order to gain insights into the primary target cells of tPA action in EAE, further studies may be conceived. For instance, passive EAE experiments may be induced with encephalitogenic T cells that would be treated with tPA prior to adoptive transfer.

tPA-induced enhancement of IL-6 cytokine production by activated splenocytes is also in favor of a pro-inflammatory role of tPA in EAE. Indeed, this cytokine is crucial for neuroinflammation as illustrated by the fact that IL-6-deficient mice are resistant to EAE [51]. However, tPA also intriguingly increases IL-10 production, a cytokine with immunomodulatory functions. However, it should be kept in mind that IL-10, as many cytokines, may have dual effects depending on the context. For example, IL-10 may have immunostimulating properties by promoting the generation of cytotoxic T cells [52] and NK cells [53], or favoring the germinal center response [54]. So, further works are needed to explore the net effect of tPA on the cytokine network and neuroinflammation in the course of EAE.

Conclusion

Our study opens new clues into the mechanisms by which tPA/plasmin axis participates in the pathogenesis of MS and its animal models. These mechanisms could be involved also in other neurological diseases such as Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease in which T cells are also involved [55]. Our study paves the way for further studies investigating the downstream targets involved in the proinflammatory effects of tPA in T cells and myeloid cells.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s12974-021-02102-5.

Additional file 1: Suppl Figure 1: Gating strategy and lymphoid cell response after EAE in WT and tPA$^{-/-}$ mice. (A) Representative gating strategy for absolute cell count analysis of leukocyte subsets in spinal cord homogenates (WT mouse, plateau phase of EAE)**. (B)** CD3+ leukocytes were gated for subpopulation analysis after using scattergram gates for viable leukocytes (in A). (C) representative flow cytometry plots for the assessment of intracellular cytokines IFNγ and IL-17 in CD4+ cells after EAE in WT and tPA$^{-/-}$. **Suppl Figure 2: T cell infiltration in the spinal cord of WT and tPA$^{-/-}$ EAE mice.** Photomicrographs show representative images (from N=3) of indicated markers in spinal cord tissue samples of WT and tPA$^{-/-}$ mice at the EAE plateau phase (d20±3) from **(A)** cervical, **(B)** upper thoracic, and **(C)** lumbar sacral. **Suppl Figure 3: Glunomab does not prevent the effect of tPA on T cells.** Splenocytes activated with both anti-CD3ε and anti-CD28 antibodies were

treated or not with tPA at 10 μg/mL in presence of Glunomab or the isotypic antibody for 4 days. Proliferation index (%) of **(A)** $CD4^+$ and **(B)** $CD8^+$ T cells in the indicated conditions. Results are expressed as mean + SEM (N=3). *$P<0.05$ *vs* control #$P< 0.05$ *vs* indicated experimental group. **Suppl Figure 4: Myeloid response of WT and $tPA^{-/-}$ mice at the plateau phase of EAE.** Representative gating strategy for absolute cell count analysis of leukocyte subsets in spinal cord homogenates of WT and $tPA^{-/-}$ mice. $CD3^-$ leukocytes were gated for subpopulation analysis after using scattergram gates for viable leukocytes (see Suppl.fig 1A)**.** **Suppl Figure 5: Myeloid response to tPA treatment.** Representative flow cytometry plots for **(A)** dendritic cells and **(B)** macrophages after tPA treatment (0-20 μg/mL). **Suppl Figure 6: Dynamic modification of immunogenic and tolerogenic DC phenotype along the EAE clinical course.** CD40 is highly present at the moment of maximum affectation and decreased when symptoms partially recover. PD-L1 is increased after the recovery of the clinical symptoms. Asymptomatic immunized mice showed a high presence of $PD\text{-}L1^+$ tolerogenic DCs. C.S= clinical score and d.p.i= day post-immunization. **Suppl Figure 7: Effect of tPA on APC maturation is not mediated by its ability to interact with NMDA receptor.** Splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were treated with 2 μg/mL tPA in presence of Glunomab or an isotypic antibody (A-H). The percentages of $MHC\text{-}II^+CD80^+CD86^+$ immunogenic and $MHC\text{-}II^+CD80^-CD86^-$ tolerogenic APCs were determined by flow cytometry. Results are expressed as mean + SEM (N=5); *$P< 0.05$, **$P<0.01$ and ***$P<0.001$.

Additional file 2: Suppl. Table 1: Antibodies used in the present study. Each antibody is indicated with its target antigen, host species, clone number, isotype and commercial reference

Abbreviations
BBB: Blood—brain barrier; CSF: Cerebrospinal fluid; DC: Dendritic cells; dpi: Day post-immunization; EGF: Epidermal growth factor; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis; IFN-γ: Interferon-γ; IL: Interleukin; Mϕ: Macrophages; MHC: Major histocompatibility complex; MOG: Myelin oligodendrocyte glycoprotein; MMP: Matrix metalloproteinase; MS: Multiple sclerosis; NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptors; tPA: Tissue-type plasminogen activator

Acknowledgements
The authors would like to thank Isabelle Wagnon and Antoine Fournier for their help with EAE experiment, Barbara Delaunay for her help in microscopy, Laurent Lebouvier for his technical input, Sara Martinez de Lizarrondo for her help with tPA activity and reagents, Rafael Lebrón-Galán and Isabel Machín-Díaz for their technical assistance, and Ángela Marquina for her help with the flow cytometry.

Authors' contributions
PH performed the experiments and wrote the article; CCT, AJM, VdS, CS, HL, SG, and LL performed experiments; MCO and IB performed experiments and drafted the paper; DV and BLM drafted the manuscript; DC, FD, and OT designed the experiments and wrote the article. The authors read and approved the final manuscript.

Funding
PH received fellowships from the Regional Council of Normandy, the *Etablissement Français du sang* (EFS) and the *Association pour la Recherche sur la Sclérose En Plaques* (ARSEP). This work was supported by the Spanish *Instituto de Salud Carlos III* grants RD16-0015-0019, PI15/00963 and PI18/00357 (partially financed by F.E.D.E.R.: European Union "*Unamanera de hacer Europa*"); ADEM-TO, ATORDEM and ESCLEROSIS MÚLTIPLE ESPAÑA. DC is financed by SESCAM. MCO holds a postdoctoral contract from the Consejería de Sanidad de Castilla-La Mancha (II-2018_07). CC-T holds a predoctoral Research Training contract PI19/00132 from the *Instituto de Salud Carlos III* (partially financed by F.S.E. "*El FSE invierte en tu futuro*"); Dr Clemente's group was sponsored by *Aciturri Aeronáutica SLA*, *Fundación Galletas Coral*, and *Embutidos y Jamones España e Hijos.*

Availability of data and materials
The data generated during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate
Animal experiments were performed following European, national, and institutional guidelines for the care and use of animals. All procedures were performed according to the guidelines of the institutional ethics committee (*Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale* (CeNomExa) and *Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Nacional de Parapléjicos*). Projects were submitted to and approved by these committees in accordance with the European directive no. 2013/63/UE (agreement number D14118001) and with the French and Spanish National and Regional Guidelines for Animal Experimentation and the Use of Genetically Modified Organisms (French Ministry of Research, project license number 02653.2, Decree 87/848; RD 53/2013 and 178/2004, Law 32/2007 and 9/2003, Decree 320/2010).

Consent for publication
Not applicable

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Author details
[1]UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Normandie Univ, Caen, France. [2]Present address: Theodor Kocher Institute, University of Bern, Freiestrasse 1, CH-3012 Bern, Switzerland. [3]Grupo de Neuroinmuno-Reparación, Hospital Nacional de Parapléjicos, Finca La Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain. [4]Hospital Nacional de Parapléjicos, Finca La Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain. [5]Department of Clinical Research, Caen University Hospital, CHU, Caen, France. [6]Department of Immunology and Immunopathology, Caen University Hospital, CHU, Caen, France.

Received: 10 June 2020 Accepted: 3 February 2021
Published online: 20 February 2021

References
1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet. 2008;372:1502–17.
2. Rijken DC, Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. J Biol Chem. 1981; 256:7035–41.
3. Angles-Cano E, Balaton A, Bonniec BL, Genot E, Elion J, Sultan Y. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue- type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. Blood. 1985;66:913–20.
4. Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, et al. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. J Exp Med. 2011;208:1229–42.
5. Docagne F, Nicole O, Marti HH, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. FASEB J. 1999;13:1315–24.
6. Soreq H, Miskin R. Plasminogen activator in the rodent brain. Brain Research. 1981;216:361–74.
7. Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, Docagne F. The plasminogen activation system in neuroinflammation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2016;1862:395–402.
8. Akenami FO, Sirén V, Koskiniemi M, Siimes MA, Teräväinen H, Vaheri A. Cerebrospinal fluid activity of tissue plasminogen activator in patients with neurological diseases. J Clin Pathol. 1996;49:577–80.
9. Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. J Neuropathol Exp Neurol. 1996;55:1194–204.
10. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. Nature Reviews Immunology. 2012;12:623–35.
11. Lu W, Bhasin M, Tsirka SE. Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis. The Journal of Neuroscience. 2002;22:10781–9.
12. Dahl LC, Nasa Z, Chung J, Niego B, Tarlac V, Ho H, et al. The influence of differentially expressed tissue-type plasminogen activator in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. PLoS

One [Internet]. 2016 [cited 2019 Sep 5];11. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948890/
13. East E, Baker D, Pryce G, Lijnen HR, Cuzner ML, Gverić D. A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. Am J Pathol. 2005;167:545–54.
14. Hébert M, Lesept F, Vivien D, Macrez R. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). Revue Neurologique. 2016;172:186–97.
15. Leonetti C, Macrez R, Pruvost M, Hommet Y, Bronsard J, Fournier A, et al. Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. Mol Neurodegener. 2017;12:20.
16. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA, Leyen T, van het Hof B, Couraud P-O, et al. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. The Journal of Immunology. 2008;181:3567–74.
17. Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, der Pol V, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain. 2016;139:2406–19.
18. András IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2007;27:1431–43.
19. Lesept F, Chevilley A, Jezequel J, Ladépêche L, Macrez R, Aimable M, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. Cell Death Dis. 2016;7:e2466.
20. Mantuano E, Azmoon P, Brifault C, Banki MA, Gilder AS, Campana WM, et al. Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity. Blood. 2017;130:1364–74.
21. Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. J Neurosci. 1997;17:543–52.
22. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. Nature. 1994;368:419–24.
23. Mishra PK, Hsuchou H, Ouyang S, Kastin AJ, Wu X, Pan W. Loss of astrocytic leptin signaling worsens experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain, behavior, and immunity [Internet]. 2013 [cited 2019 Sep 6];34. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3818286/
24. Moliné-Velázquez V, Ortega MC, Vila del Sol V, Melero-Jerez C, de Castro F, Clemente D. The synthetic retinoid Am80 delays recovery in a model of multiple sclerosis by modulating myeloid-derived suppressor cell fate and viability. Neurobiol Dis. 2014;67:149–64.
25. Briens A, Bardou I, Lebas H, Miles LA, Parmer RJ, Vivien D, et al. Astrocytes regulate the balance between plasminogen activation and plasmin clearance via cell-surface actin. Cell Discov. 2017;3:17001.
26. Melero-Jerez C, Suardíaz M, Lebrón-Galán R, Marín-Bañasco C, Oliver-Martos B, Machín-Díaz I, et al. The presence and suppressive activity of myeloid-derived suppressor cells are potentiated after interferon-β treatment in a murine model of multiple sclerosis. Neurobiol Dis. 2019;127:13–31.
27. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. Nat Med. 2001;7:59–64.
28. Boldyrev AA, Kazey VI, Leinsoo TA, Mashkina AP, Tyulina OV, Johnson P, et al. Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2004;324:133–9.
29. Mashkina AP, Tyulina OV, Solovyova TI, Kovalenko EI, Kanevski LM, Johnson P, et al. The excitotoxic effect of NMDA on human lymphocyte immune function. Neurochem Int. 2007;51:356–60.
30. Siao C-J, Tsirka SE. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. J Neurosci. 2002;22:3352–8.
31. Dahl LC, Nasa Z, Chung J, Niego B, Tarlac V, Ho H, et al. The influence of differentially expressed tissue-type plasminogen activator in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. PLoS One [Internet]. 2016 [cited 2020 Dec 2];11. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948890/
32. Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. Trends Neurosci. 2009;32:48–55.
33. Melero-Jerez C, Alonso-Gómez A, Moñivas E, Lebrón-Galán R, Machín-Díaz I, de Castro F, et al. The proportion of myeloid-derived suppressor cells in the spleen is related to the severity of the clinical course and tissue damage extent in a murine model of multiple sclerosis. Neurobiol Dis. 2020;140:104869.
34. Budde MD, Kim JH, Liang H-F, Russell JH, Cross AH, Song S-K. Axonal injury detected by in vivo DTI correlates with neurological disability in a mouse model of multiple sclerosis. NMR Biomed. 2008;21:589–97.
35. Bannerman PG, Hahn A, Ramirez S, Morley M, Bönnemann C, Yu S, et al. Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. Brain. 2005;128:1877–86.
36. Mizrachi T, Gur-Wahnon D, Al-Roof Higazi A, Brenner T. Role of tissue plasminogen activator in clinical aggravation of experimental autoimmune encephalomyelitis and its therapeutic potential. Cellular Immunology. 2020;348:104040.
37. Álvarez-Sánchez N, Cruz-Chamorro I, Álvarez-López AI, López-González A, Lacalle Remigio JR, Lardone PJ, et al. Seasonal variations in macrophages/microglia underlie changes in the mouse model of multiple sclerosis severity. Mol Neurobiol. 2020;57:4082–9.
38. Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, Docagne F. The plasminogen activation system in neuroinflammation. Biochim Biophys Acta. 1862;2016:395–402.
39. Wang J, Zhang X, Mu L, Zhang M, Gao Z, Zhang J, et al. t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Immunol. 2014;152:90–100.
40. Wang X, Lee S-R, Arai K, Lee S-R, Tsuji K, Rebeck GW, et al. Lipoprotein receptor–mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. Nat Med. 2003;9:1313–7.
41. Davis GE, Pintar Allen KA, Salazar R, Maxwell SA. Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. J Cell Sci. 2001;114:917–30.
42. Benson HL, Mobashery S, Chang M, Kheradmand F, Hong JS, Smith GN, et al. Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4+ and CD8+ T cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011;44:700–8.
43. Hurtado M, Lozano JJ, Castellanos E, López-Fernández LA, Harshman K, Martínez-A C, et al. Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. Gut. 2007;56:1266–74.
44. Lorenz N, Loef EJ, Kelch ID, Verdon DJ, Black MM, Middleditch MJ, et al. Plasmin and regulators of plasmin activity control the migratory capacity and adhesion of human T cells and dendritic cells by regulating cleavage of the chemokine CCL21. Immunol Cell Biol. 2016;94:955–63.
45. Flanagan K, Moroziewicz D, Kwak H, Hörig H, Kaufman HL. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naïve T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4+ T cells. Cell Immunol. 2004;231:75–84.
46. Zeboudj L, Maître M, Guyonnet L, Laurans L, Joffre J, Lemarie J, et al. Selective EGF-receptor inhibition in CD4+ T cells induces anergy and limits atherosclerosis. J Am Coll Cardiol. 2018;71:160–72.
47. Shaw MA, Gao Z, McElhinney KE, Thornton S, Flick MJ, Lane A, et al. Plasminogen deficiency delays the onset and protects from demyelination and paralysis in autoimmune neuroinflammatory disease. J Neurosci. 2017;37:3776–88.
48. Min K, Jou I, Joe E. Plasminogen-induced IL-1beta and TNF-alpha production in microglia is regulated by reactive oxygen species. Biochem Biophys Res Commun. 2003;312:969–74.
49. Kumai T, Matsuda Y, Oikawa K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, et al. EGFR inhibitors augment antitumour helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy. Br J Cancer. 2013;109:2155–66.
50. Casacuberta-Serra S, Costa C, Eixarch H, Mansilla MJ, López-Estévez S, Martorell L, et al. Myeloid-derived suppressor cells expressing a self-antigen ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. Exp Neurol. 2016;286:50–60.
51. Eugster H-P, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol. 1998;28:2178–87.
52. Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, et al. IL-10 elicits IFNγ-dependent tumor immune surveillance. Cancer Cell. 2011;20:781–96.
53. Qian C, Jiang X, An H, Yu Y, Guo Z, Liu S, et al. TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. Blood Am Soc Hematol. 2006;108:2307–15.

54. Laidlaw BJ, Lu Y, Amezquita RA, Weinstein JS, Vander Heiden JA, Gupta NT, et al. Interleukin-10 from CD4+ follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. Sci Immunol. 2017;2.
55. Schetters STT, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, Van Kooyk Y. Neuroinflammation: microglia and T cells get ready to tango. Front Immunol [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 27];8. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5788906/

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

BMC

Border-associated macrophages (BAMs) play a central role in the regulation of the neuroimmune response following stroke in aged mice

Damien Levard [1], **Célia Seillier** [1], Gaetan Riou [2], Lukas Amann [3], Marco Prinz [3], Denis Vivien [1,4], Marina Rubio [1,*]

[1] *Normandie University, UNICAEN, INSERM UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @ Caen-Normandie (BB@C), 14000 Caen, France*
[2] *Normandie University, UNIROUEN, Inserm, U1234, FOCIS Center of Excellence PAn'THER, Rouen University Hospital, Department of Immunology and Biotherapy, Rouen, France*
[3] *Institute of Neuropathology, Medical Faculty, University of Freiburg, Breisacher Str. 64, Freiburg, Germany*
[4] *Department of Clinical Research, Caen-Normandie University Hospital, CHU, Avenue de la côte de Nacre, Caen, France*

Abstract

Ischemic stroke is one of the main causes of death and permanent disability worldwide. Stroke-induced inflammatory processes, including the activation of resident glial cells as well as the invasion of circulating leukocytes, have been proposed as key contributors of the ischemic stroke pathophysiology. While the responses of microglia to ischemic stroke have been extensively studied, those of border-associated macrophages (BAMs) remain largely unknown. In this study, we hypothesized that BAMs could influence stroke-induced inflammatory responses, particularly during aging and thus final stroke recovery. We thus compared stroke outcome in young and old mice subjected to thromboembolic stroke with or without a previous depletion of BAMs. Our results show that functional outcome following stroke was worsened in depleted mice without modification of the lesion volumes, exclusively in aged mice. This worsening in the functional outcome was accompanied by (i) an increase of endothelial P-selectin expression (measured by molecular MRI and IHC), (ii) an increased leukocyte rolling and adhesion to the vessel wall (measured by two-photon *in vivo* imaging), and (iii) an increased leukocyte infiltration (measured by flow cytometry and IHC) in the injured hemisphere. These exacerbated immune responses were present at both the acute and the sub-acute phase (up to 5 days) after stroke onset, thus suggesting that the presence of BAMs ensures a long-term control of the immune response after stroke. Using cell sorted RNAseq, we show that BAMs change their transcriptomic phenotype during aging, overexpressing genes implicated in the regulation of both innate and adaptive immune responses and antigen presentation. Taken together, our results reveal that BAMs play a central role in the regulation of the neuroimmune response following stroke, especially during aging, and that BAMs guarantee a long-term fine-tuning of the immune responses after stroke.

List of abbreviations used in the text:

ALS: amyotrophic lateral sclerosis

ATP: adenosine triphosphate

BAMs: CNS border-associated macrophages

BBB: blood brain barrier

CD: cluster of differentiation

ChPM: choroid plexus macrophages

CLO: clodronate liposomes

CNS: central nervous system

COLA6A1: collagen type VI alpha 1

COLIV: collagen type IV

DAPI: 4′,6-diamidino-2-phenylindole

FACS: fluorescence-activated cell sorting

FITC: fluorescein isothiocyanate

GFAP: glial fibrillary acidic protein

GFP: green fluorescent protein

IHC: immunohistochemistry

Ly6G: lymphocyte antigen 6 complex locus G6D

MCAo: middle cerebral artery occlusion

MHCII: major histocompatibility complex class II

MM: meningeal macrophages

MPIOs: microparticles of iron oxide

MRI: magnetic resonance imaging

PBS: phosphate buffered saline liposomes

Psel: P-selectin

PVM: perivascular macrophages

RNA: ribonucleic acid

RNAseq: RNA sequencing

SPP1: secreted phosphoprotein 1

Introduction

Ischemic stroke is one of the main causes of death and permanent disability worldwide (Katan and Luft, 2018). Lack of adequate blood supply to a brain region causes brain damages and triggers sterile inflammation and innate immune responses (Anrather and Iadecola, 2016). Stroke-induced inflammatory processes are a response to the tissue damage due to the absence of blood supply and have been proposed as a key contributors to all the stages of the ischemic stroke pathophysiology (Drieu et al., 2018).

The CNS contains different subsets of resident myeloid cells including microglia and border-associated macrophages (BAMs), i.e., macrophages located at the CNS "borders": between the parenchyma and blood vessels (perivascular macrophages, PVMs), within the meninges (meningeal macrophages, MMs) and at the choroid plexus (choroid plexus macrophages, ChPMs) (Utz and Greter, 2019). In physiological conditions, BAMs display scavenger functions, by clearing cellular debris from the CNS (Kida et al., 1993; Mendes-Jorge et al., 2009) and by presenting antigens to lymphocytes (Fabriek et al., 2005). However, their roles in pathological conditions are less known. PVMs have been identified as modulators of neurovascular coupling in models of chronic hypertension (Faraco et al., 2016), and Alzheimer disease (Park et al., 2017). It has been demonstrated that PVMs can produce reactive oxygen species and cytokines, linking them to the inflammatory response (Faraco et al., 2016). In addition to this, BAMs and particularly PVMs could play a major role in post-stroke inflammation because of their strategic location at the interface between the bloods vessels, the brain parenchyma and the circulating immune system. Accordingly to this, they have been described as modulators of granulocyte infiltration and blood-brain barrier integrity after stroke (Pedragosa et al., 2018). Also, we have previously shown that BAMs modulate the post-stroke inflammatory responses in a context of neuroinflammatory priming induced by excessive alcohol consumption, known as a preeminent modifiable risk factor of stroke (Drieu et al., 2020).

Most of the preclinical studies on stroke have been conducted in young male rodents. However, age is the most significant non-modifiable risk factor for many human diseases, and the single most important risk factor for ischemic stroke (Sacco et al., 1997; Popa-Wagner et al., 2020; Virani et al., 2020). With

every decade of life, the incidence of stroke more than doubles (Mozaffarian et al., 2016). Advanced age is associated with profound pathophysiological changes in both the CNS and the periphery, which underlie the increased susceptibility of the brain to ischemic injury (Candelario-Jalil and Paul, 2021). In spite of all these facts, most of the preclinical stroke research (including stroke-induced inflammatory responses and the role of BAMs in stroke) have been conducted in young, healthy animals.

Based on previous studies (Drieu et al., 2020), we hypothesized that BAMs could shift stroke outcome and the stroke-induced inflammatory responses in a different manner depending on the inflammatory status of the brain prior stroke onset, and particularly during aging. To test this hypothesis, we compared stroke outcome in young and aged mice with or without a previous BAMs depletion. Our results showed that stroke functional outcome was worsened in aged BAMs-depleted mice and was accompanied by (i) an increased endothelial P-selectin expression, (ii) an increased leukocyte rolling and adhesion to the vessel wall, and (iii) an increased leukocyte infiltration in the injured hemisphere. Interestingly, these exacerbated inflammatory responses were not accompanied by changes in lesion volume. Finally, by using RNAseq analysis from isolated BAMs, we show that BAMs change their transcriptomic phenotype during aging to overexpress genes implicated in the regulation of both innate and adaptive immune response and antigen presentation. Taken together, our results unmask a new role of BAMs following stroke as central coordinators of the neuroimmune response, especially during aging.

Results

Identification of BAMs and characterization of their depletion.

For this study, we wanted to focus on the migration of immune cells across the blood brain barrier (BBB) after stroke. For this reason, we first focused our IHC experiments exclusively on PVMs (which surround brain blood vessels and are located in the perivascular space). Sub-meningeal PVMs are positive for the scavenger receptor CD206 (**Figure 1A-D**), whereas microglia is negative for CD206 but positive for P2Ry12 (**Figure 1B**) and Iba1 (**Figure 1F**). PVMs are located in the perivascular space around blood vessels, between the basal lamina and the *glia limitans* formed by the astrocytic end-feet (**Figure 1C, D**).

To determine the roles of PVMs, we depleted them by injecting clodronate-encapsulated liposomes (Clodronate-liposomes; CLO) in the lateral ventricle (control mice received PBS-encapsulated liposomes; Vehicle). When injected into the lateral ventricle, clodronate liposomes diffuse into the CSF, around the brain through the subarachnoid space, as well as into the perivascular spaces. When the liposomes meet the macrophages, they are phagocytosed and the clodronate is then released in the cell, which induces its death by apoptosis (Polfliet *et al.,* 2001; Moriyama and Nomura, 2018). Thus, this method makes it possible to deplete all the BAMs present in the CSF.

We assessed the depletion of BAMs 5 days after CLO or Vehicle injection using IHC and flow cytometry (**Figure 1E**). As previously described in other studies (Polfliet *et al.,* 2001; Drieu *et al.,* 2020), the injection of CLO liposomes reduces by at least 80% the number of PVMs (measured by IHC in the sub-meningeal areas) compared to the vehicle group (**Figure 1G**). The depletion induced by CLO injection is specific for BAMs and does not affect the microglia (**Figure 1G**). It is important to note that in the flow cytometry experiments meninges were maintained when extracting the brains, so the whole BAMs population (including PVMs, MMs and ChPMs) was detected. We confirm that 5 days after CLO injection, there is a specific depletion of BAMs ($CD11b^+$ $CD45^+$ $CD206^+$ cells) which does not affect the microglia ($CD11b^+$ $CD45^{low}$) (**Figures 1H, 1I**). No increase in microglial activation ($CD11b^+$ $CD45^{high}$) or in the number of neutrophils ($CD11b^+$ $CD45^+$ $Ly6G^+$) was observed, which indicates that 5 days after its injection, there is no inflammatory reaction induced by CLO itself (**Figures 1H, 1I**).

Inflammatory priming in the brain of aged mice is not accompanied by changes in the number or the morphology of BAMs.

In a previous study, we showed that alcohol exposure induces an inflammatory priming in the brain of mice that was characterized by an increase of the microglial activation and of PVMs numbers (Drieu *et al.,* 2020). It is well admitted that aging could correspond to a certain kind of neuroinflammatory priming (Niraula, Sheridan and Godbout, 2017). For this reason, we decided to study the inflammatory status of elderly brains in mice (18 months old) compared to young ones (2 months old). We observed by flow cytometry that there was no difference in the number of PVMs between young and old mice (**Figure 2A-C**). However, we observed a significant increase in activated microglia ($p<0.01$, n= 6 mice/group; **Figure 2B-D**), in the number of neutrophils ($p<0.01$, n= 6 mice/group; **Figure 2B-D**), $CD4^+$ T cells ($p<0.05$; n= 5 mice/group; **Figure 2E, F**) and $CD8^+$ T cells ($p<0.01$; n= 5 mice/group; **Figure 2E, F**) in the brain of old mice compared to young mice. These results were confirmed by IHC analyses, in which we did not observe a difference in the number of $CD206^+$ BAMs (**Figure 2G-H**). We confirmed the increase in activated microglia expressing the lysosomal marker CD68, characteristic of phagocytosis (6.2 ± 0.9 *vs* 49.5 ± 6.4 $Iba1^+CD68^+$ cells per mm^2), while the total number of microglia did not change ($Iba1^+$; **Figure 2I-J**). We therefore confirm an increased inflammatory status in the apparently healthy brains of aged mice, without changes in the number or morphology of BAMs.

BAMs depletion worsens stroke functional outcome in aged mice but not in young mice.

We performed thromboembolic stroke 5 days after the injection of CLO or Vehicle in young and old mice. Functional recovery tests and MR imaging examinations were performed 24h after stroke onset (**Figure 3A**). In young mice, the depletion of BAMs had no impact on the functional deficit (**Figure 3B, C**), the distribution of the lesion (**Figure 3D**), the ischemic lesion volume (**Figure 3F**), the recanalization rate (**Figure 3H**) or the hemorrhagic transformation score (**Figure 3J**).

Interestingly, aged mice subjected to thromboembolic stroke showed a significantly higher functional deficit specifically in the BAMs-depleted group. This deficit was observed by measuring both the overall strength of the two forepaws ($p<0.001$; n= 10 mice PBS group/ 15 mice CLO group; 10.3 ± 1.8 *vs* 25.4 ± 2.2 % deficit respectively; **Figure 3B**) and the specific strength of the left paw (the side affected by

the stroke) ($p<0.05$; n= 10 mice PBS group/ 15 mice CLO group; 16.1 ± 3.7 *vs* 28.3 ± 3.3 % deficit respectively; **Figure 3C**). This difference in the functional deficit was neither due to a difference in lesion distribution or volume (**Figure 3E, F**) nor the recanalization score (**Figure 3H**). No significant difference was found in the hemorrhagic score, although more petechial hemorrhages or small subarachnoid bleeds (Score 1) were observed in the CLO group compared to Vehicle (37.5 % in the aged-depleted mice vs 12.5 % in aged-control mice; **Figure 3J**).

BAMs depletion increases the expression of the P-selectin adhesion molecule after stroke in aged mice but not in young mice.

In order to study the role of PVMs on endothelial activation and possible associated inflammatory reactions after ischemic stroke, we performed molecular imaging and immunohistological analyses of P-selectin (P-sel), an adhesion molecule responsible of leukocyte rolling on the vessel wall (**Figure 4A**), which is one of the first steps of leukocyte infiltration across the blood-brain-barrier (BBB). The expression of P-sel was *in vivo* detected by using specific anti-P-sel coupled microparticles of iron oxide (MPIOs). Thus, when P-sel is expressed by activated endothelial cells, the antibodies fixed to the MPIOs recognize and bind to P-sel molecules (**Figure 4B**). MPIOs then reveal a hypointense signal on MRI and are thus visible on a T2-star sequence (**Figure 4C**).

MPIOs signal was significantly increased in the cortex ipsilateral to the ischemia in aged mice previously depleted of their BAMs compared to aged mice not depleted (22.8 ± 5.5 *vs* 37.6 ± 2.9 % cortex area; $p<0.05$, n=7 mice/group; **Figure 4D**). There was no difference between the two groups in young mice. We also measured P-selectin signal by IHC on brain sections. No difference was observed in the number of P-sel$^+$ vessels twenty-four hours after stroke onset between the vehicle and CLO-treated groups in young or aged mice (**Figure 4G**). By contrast, 5 days after the stroke, the number of P-sel$^+$ vessels and the P-sel$^+$ signal area was significantly increased in aged mice with a previous depletion of BAMs ($p<0.05$, n=5 mice/group; **Figures 4G**, **4H**).

BAMs influence the intracerebral trafficking of leukocytes following ischemic stroke.

We used intravital two-photon microscopy to study the role of PVMs in leukocyte adhesion to the vessel wall, and to determine the functional impact of the increased expression of P-selectin. We measured

leukocyte adhesion and rolling in both young and aged mice previously treated with Vehicle or CLO, 24h after stroke onset (**Figure 5A**). We performed intravenous injection of FITC-Dextran (70 kDa) (**Figure 5B**) allowing blood vessels visualization and Rhodamine-6G (4 kDa) for leukocytes staining (**Figure 5C**). We observed a significant decrease in the number of leukocytes adhered to the vessel wall in young BAMs-depleted mice, but no difference in the number of rolling leukocytes ($p<0.05$, n=5 mice/group). By contrast, in aged mice previously depleted of BAMs, we detected a significant increase in both the number of rolling and adherent leukocytes ($p<0.05$, n=5 mice/group; 0.5 ± 0.2 *vs* 1.39 ± 0.2 rolling leukocytes; 1.34 ± 0.5 *vs* 3.87 ± 1.65 adherent leukocytes; **Figures 5E, F**).

BAMs depletion exacerbates neuroinflammation and infiltration of peripheral immune cells after stroke in aged mice.

We next wanted to test whether the increased vascular inflammation observed in aged BAMs-depleted mice was accompanied by a higher infiltration of immune cells into the brain parenchyma. We studied the cellular immune responses triggered at different time points after stroke onset by flow cytometry (**Figure 6, 7**) and IHC (**Figure 8, 9**). In agreement with the results on vascular inflammation, we observed a significant increase in all of the immune cell types studied in aged BAMs-depleted mice (**Figure 7**, **Figure 9**), with an increase in the infiltration of neutrophils (**Figure 7C**, **Figure 9J**) and $CD4^+$ T cells (**Figure 7E**, **Figure 9L**) from 24h to 5 days after stroke by both IHC and flow cytometry. We also observe an increase in microglial activation in aged-depleted mice (**Figure 7C**).

Using flow cytometry, we observed in young BAMs-depleted mice a slight but significant increase in $CD4^+$ T cells 2 days after stroke onset ($p<0.05$, n=7 mice/group; **Figure 6E**) followed by a decrease in the number of these same cells in the perilesional area and in the ischemic core at 5 days when measured by IHC ($p<0.01$, n=7 mice/group; **Figure 8L**). We also observed in young BAMs-depleted mice an increase in microglia and microglial activation in the perilesional area 24h after stroke onset ($p<0.05$, n=7 mice/group; **Figure 8D, H**). This increase is not found in the quantification of the ipsilateral hemisphere by cytometry 48 hours after the stroke (**Figure 6C**).

BAMs change their transcriptomic phenotype during aging by overexpressing genes implicated in the regulation of both innate and adaptive immune responses, including cell adhesion and cytokine-mediated signaling pathways.

Given the differences in the immune and inflammatory responses observed specifically in aged BAMs-depleted mice subjected to stroke, the next step was to determine whether BAMs genic expression was influenced by aging. In other words, we wanted to know if the different impact, after stroke, of the depletion of BAMs observed between young and aged mice could be due to a different phenotype of BAMs acquired during aging, making them become master regulators of the neuroinflammatory response.

We therefore sorted BAMs from young and aged mouse brains and performed RNAseq analysis (**Figure 10A**). Out of all the 9143 genes detected in BAMs, 30 genes are downregulated and 90 are upregulated in the BAMs of aged mice compared to young mice (**Figure 10B, C**). The Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) aggregates the per gene statistics across genes within a gene set, therefore making it possible to detect situations where all genes in a predefined set change in a small but coordinated way. The GSEA analysis was started on the Gene sets derived from the GO Biological Process ontology database. We have thus demonstrated 58 upregulated pathways in BAMs of old mice compared to young. In the list of the 30 most regulated biological pathways, we found a large majority of pathways involved in regulation of the innate and adaptive immune response. **(Figure 10D**). The clueGO tool (Bindea *et al.,* 2009) was used to visualize pathway groupings according to the terms used in the gene ontology database. Pathways with a p-value <0.05 in the GSEA analysis based on GO biological process data are grouped into four clusters: the “innate and adaptive immunity” cluster containing 72.97% of the pathways, the “antigen presentation” cluster containing 16.22% of the pathways, the “cellular response to heat” cluster contains 5.41% of the pathways, and the “regulation of fibroblast proliferation” cluster containing 5.41% of the pathways (**Figure 10E**). We thus show that BAMs change their transcriptomic phenotype during aging and overexpress genes implicated in the regulation of innate and adaptive immune responses.

Discussion

In this study we aimed to study the specific role of PVMs on acute ischemic stroke, with a particular focus on the inflammatory response in both young and aged mice. We hypothesized that aging, by driving a primed neuroinflammatory state, could shift BAMs phenotype, giving them a more important role in the modulation of the neuroinflammatory responses to stroke. To study this, we compared young and old control with corresponding BAMs-depleted mice at the acute and sub-acute phases of ischemic stroke. Next, we isolated BAMs from young and old mice and performed transcriptomic analyses. Our results show that BAMs in old mice overexpress genes implicated in the regulation of both innate and adaptive immune responses, including cell adhesion and cytokine-mediated signaling pathways.

Our present results in young mice show that BAMs do modulate the neuroinflammatory response, but that this does not influence the final ischemic lesion size or neurological deficits after thromboembolic stroke. These data are in agreement with a previous report from our group in a model of thromboembolic stroke in young mice subjected to an inflammatory priming (induced by excessive alcohol consumption), including a previous depletion of BAMs (Drieu et al., 2020). Interestingly, another study performed in a model of transient (filament) ischemic stroke in young mice described that the previous depletion of BAMs showed less granulocyte infiltration and increased permeability of blood vessels but was also not associated to changes in lesion volume. However, in this study, the authors report that a depletion of BAMs contributed to exacerbated neurological dysfunctions at the acute phase of ischemia/reperfusion (Pedragosa et al., 2018). The discrepancies between these studies might be due to the experimental model of stroke used in each case, on which the inflammatory response timing is different and processes like secondary microthrombosis after the filament removal are inexistent in thromboembolic models (Gauberti et al., 2014; Levard et al., 2020). However, when we used aged mice subjected to the same paradigms of thromboembolic stroke with or without previous depletion of BAMs, we observed that although stroke damages such as lesion volume were not significantly affected by BAMs depletion, their neurological deficits were worsened. Thus, these data suggest that aging acts as a neuroimmune “primer” that changes BAMs phenotype, and play a critical role in the influence of final outcome following ischemic stroke.

Our results also show that after stroke, and specifically in aged mice, the depletion of BAMs is associated to (i) a significant increase in the endothelial adhesion molecule P-selectin; (ii) a significant increase in leukocyte rolling and adhesion; and (iii) an increased parenchymal infiltration of neutrophils, macrophages, as well as CD4+ and CD8+ T cells. Importantly, these exacerbated immune responses are present not only at the acute phase after stroke, but also at the sub-acute phase (up to 5 days after stroke onset), thus suggesting that the presence of BAMs ensures a long-term control of the immune response after stroke.

Interestingly, the numbers of BAMs do not seem to be important on regulating the neuroimmune responses to stroke, but the reprogramming of the gene expression profile of BAMs seems to be crucial for the stroke-induced immune responses. This reprogramming has been described in the context of stroke by Pedragosa et al. (2018), where the authors describe transcriptomic changes that have a rapid impact on leukocyte chemotaxis and blood-brain barrier integrity, and promote neurological impairment in the acute phase of stroke. A similar effect on the reprogramming of BAMs seems to take place during aging, where BAMs seem to acquire a more important role on orchestrating the inflammatory responses triggered by stroke.

In the CNS, inflammatory priming mainly describes the phenotype and reactivity of microglial cells: after undergoing an initial stimulus, microglial cells exhibit an exaggerated inflammatory response to a second stimulus (Haley et al., 2019). Subsequent studies have since shown that inflammatory brain priming can also be triggered by chronic stimuli, including stress, diabetes, hypertension, chronic alcohol use, and even aging (Muriach et al., 2014; Norden, Muccigrosso and Godbout, 2015; Winklewski et al., 2015; Drieu et al., 2020). A previous study of high-dimensional single-cell mapping of CNS myeloid cells showed that during aging, there was an increase in the number of BAMs expressing major histocompatibility complex class II (MHCII), suggesting an increased role in antigen presentation (Mrdjen et al., 2018). In our study, by focusing specifically on the transcriptomic changes of BAMs during aging, we confirm this observation. Indeed, we show that aging also induces a series of transcriptomic changes in BAMs, affecting genes involved in innate and adaptive immune response, antigen presentation, cellular response to heat and fibroblast proliferation.

Interestingly, and apart from phenomena related to the immune response, our transcriptomic results reveal that BAMs overexpress during aging genes linked to the regulation of fibroblast proliferation. Recent studies have begun to shine light on the fibroblasts present in the meninges, choroid plexus and perivascular spaces of the brain and spinal cord, i.e. in direct contact with BAMs. Although the origins and functions of CNS fibroblasts are still being described, recent work has revealed that fibroblasts play crucial roles in fibrotic scar formation in the CNS after injury, including stroke (Dorrier et al., 2021). In Col1a1-GFP mice, both PDGFRβ+ and GFP+ cells, which were referred as stromal cells, increased in number in the lesion core surrounded by fibrotic proteins following a middle cerebral artery occlusion by filament (Fernández-Klett et al., 2013). With regard to neurodegeneration, in the pre-symptomatic stages of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the fibroblast marker genes SPP1 and COLA6A1 are enriched and their protein products accumulate in the perivascular spaces. Increased expression levels of these genes predicted shorter survival times in patients with ALS, indicating that perivascular fibroblasts contribute to early dysfunction during the disease progression (Månberg et al., 2021). Thus, future studies could investigate the existing links between BAMs and fibroblasts, especially in the case of post-stroke scars or neurodegenerative pathologies.

A limitation of our study is the lack of very long-term measurements. Indeed, we focused on the acute and sub-acute inflammatory reactions, 24 hours to 5 days after the stroke. It would have been interesting to question the role of BAMs on the resolution of inflammation and long-term functional recovery. The thromboembolic model of stroke used in this study seems to be one of the closest to human pathophysiology and may thus provide an opportunity to study not only fibrinolytic drugs but also strategies targeting inflammation and immune responses triggered after the onset of stroke (Levard et al., 2020); however, our study could be improved by comparing our data with other experimental model of stroke. The other limitation of the study is the use of liposomes containing clodronate. Indeed, the initial study focused on the role of PVMs which, due to their strategic location, could modulate leukocyte transmigration through the BBB. However, it is clear that the clodronate liposomes injected into the cerebral lateral ventricle in this study target all BAMs (i.e. PVMs, MMs, ChPMs) without distinction, due to their common location in the CSF. We therefore cannot determine the specific roles of each

subpopulation of BAMs on the inflammatory reaction induced after stroke. It is a safe bet that ChPMs and MMs play a major role, with the appearance of many recent studies describing the meninges and choroid plexuses as major entry routes to the CNS for inflammatory cells (Llovera et al., 2014; Benakis, Llovera and Liesz, 2018; Alves de Lima, Rustenhoven and Kipnis, 2020).

Taken together, our results reveal that BAMs acquire, during aging, a central role in orchestrating the neuroimmune responses triggered by stroke, and that BAMs guarantee a long-term fine-tuning of the immune responses after stroke.

Methods

Animals

Two months-old male (Young group) and 18 months-old male (Aged group) C57/BL6J (Janvier Labs) mice were housed (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Normandy University, Caen, France) at 21° C in a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. All mice were checked daily for health and abnormal behavior. For intravital two-photon imaging, male C57BL/6J CX3CR1-GFP$^{+/-}$ mice were used.

All the procedures needing anesthesia were performed by an initial exposure to 5% isoflurane followed by a maintaining phase of 1.5-2% isoflurane 30%O_2/70%N_2O during experiments.

Depletion of border-associated macrophages (BAMs)

Anesthetized mice were placed in a stereotaxic device. Then the skin was removed and a small craniotomy was performed (coordinates: -0.2mm anteroposterior; +1mm lateral; -2mm depth from the Bregma). A glass micropipette containing 10µl PBS-liposomes (Vehicle-liposomes group) or clodronate-encapsulated liposomes (Clodronate-liposomes group; CLO) (purchased at clodronateliposomes.com) was inserted and the product was gently injected in the left lateral ventricle during 20 minutes. CLO liposomes injected into the cerebral ventricles are phagocytized by BAMs and, once in the cytosol, CLO acts as a cytotoxic ATP analog, which impairs mitochondrial oxygen consumption leading to cell death (Lehenkari *et al.,* 2002). In order to minimize the pro-inflammatory effects of CLO *per se*, the intracerebroventricular (icv) injection of CLO was performed 5 days before the stroke.

Thromboembolic stroke

We used the *in situ* thromboembolic stroke model consisting in the injection of thrombin directly into the middle cerebral artery (MCA) as described before (Orset *et al.,* 2007). Briefly, anesthetized mice were placed in a stereotaxic device, a small craniotomy was performed, the dura was excised, and the MCA was exposed. A pulled glass micropipette was introduced into the lumen of the MCA and 1 µL

(1.5 UI/µl for C57BL/6J mice) of purified murine alpha-thrombin (Enzyme Research Labs, USA) was pneumatically injected to induce MCA occlusion (MCAo) by the *in situ* formation of a clot. Lesion volumes were quantified by Magnetic Resonance Imaging (MRI) on Image J software 24 hours after stroke onset. The pipette was removed 10 minutes after, when the clot had stabilized. Cerebral blood flow was monitored before and up to 20 min after MCAo.

Intravital two-photon microscopy

Anesthetized mice were placed in a stereotaxic device and aqueous medium was deposed between the thin-skull window and the X25 immersive objective. One hundred µl of Rhodamine 6G (1mg/kg) and 100 µl of 70kDa FITC-Dextran (5mg/ml) (Sigma Aldrich, France) were injected in the tail vein to stain circulating leukocytes and to visualize the lumen of blood vessels, respectively. Acquisitions were performed using a Leica TCS SP5 MP microscope at 840 nm two-photon excitation wavelength (Coherent Chameleon, USA). Photomultiplier (PMT) 2 (recorded capacity: 500-550nm; gain 850V; offset 0) and PMT3 (recorded capacity: 565-605nm; gain 850V; offset 0) were used. The pulsing laser characteristics were: gain 23%; trans 17%; offset 50%.

Leukocyte rolling/adhesion counting

Leukocyte adhesion and rolling to venular endothelium were measured after the intravenous injection of 100 µl of Rhodamine 6G (1mg/kg) and 100 µl of 70kDa FITC-Dextran (5mg/ml) (Sigma Aldrich, France) to stain circulating leukocytes and visualize the lumen of blood vessels, respectively.

For adherent leukocyte quantification, the images obtained by time-lapse (2 minutes, 7.7 frames per second, 256x256 pixel resolution, 1000Hz frequency) were compiled and red spots, corresponding to adherent leukocytes, were counted for each group. For rolling leukocytes, we used the Kymograph plugin on ImageJ software (developed by J. *Rietdorf* and A. *Seitz*) (line width perpendicular to vessel lumen: 10; size pixel^2 after threshold: (2-5)-infinity). Leukocytes that were too fast were considered as background and not counted as rolling leukocytes.

Magnetic Resonance Imaging

Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane and maintained with 1.5-2% isoflurane 30%O_2/70%N_2O during the acquisitions. Experiments were carried out on a Pharmascan 7T (Bruker, Germany). T2-weighted images were acquired using a multislice multiecho sequence: TE/TR 33 ms/2500 ms. Lesion sizes were quantified on these images using ImageJ software. Mice showing lesions <6mm3 at 24h post MCAo were considered as surgical failure and excluded from the analyses.

T2*-weighted sequences were used to control if animals underwent hemorrhages events. Two-dimensional time-of-flight angiographies (TE/TR 12 ms/7 ms) were acquired and analyses of the MCA angiogram were also performed to control the recanalization status of the MCA. The angiographic score is inspired on the TICI grade flow scoring. Score 0 refers to the absence of any anterograde flow beyond the MCA. Score 1 is incomplete filling of the distal bed. Score 2 is almost complete filling of the distal territory. Score 3 is complete filling of the distal territory.

Molecular Imaging of P-Selectin

Micro-sized particles of iron oxide (MPIOs) (diameter 1.08 mm) (Invitrogen) covalently conjugated to purified polyclonal goat anti-mouse antibodies for P-selectin (R&D Systems, clone AF737) were prepared as previously described. The quality of conjugated MPIOs was systematically checked in a naive mouse, by stereotaxic injection of lipopolysaccharide (1µl, 1mg/kg) in the striatum (0.5mm anterior, 2.0mm lateral, -3mm ventral to the Bregma).

Three-dimensional T2*- weighted gradient echo imaging with flow compensation (spatial resolution of 70 mm x 70 mm x 70 mm interpolated to an isotropic resolution of 70 mm), TE/TR 13.2ms/200 ms and a flip angle of 21° was performed to visualize MPIOs. MRI acquisitions started immediately after the intravenous injection of MPIOs (200 µl of 2 mg Fe/kg of conjugated MPIOs). All T2*-weighted images presented are minimum intensity projections of six consecutive slices. The signal void quantification of MPIOs on 3D T2*-weighted images was measured by using automatic triangle threshold in ImageJ software and results presented as MPIOs-induced signal void on the contralateral cortex divided by the signal void on the structure of interest (in percent).

Immunohistochemistry

Terminally anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (15 mL/min) and fixed with 50 mL of 4% paraformaldehyde phosphate buffer (pH 7.4). Brains were post-fixed with 4% paraformaldehyde phosphate buffer (18 hours; 4°C) and cryoprotected (sucrose 20% in PBS; 24 hours; 4°C) before freezing in Tissue-Tek (Miles Scientific, Naperville, IL, USA). Cryostat-cut sections (10 µm) were collected on poly-lysine slides and stored at – 80°C before processing.

Sections were co-incubated overnight with goat anti-mouse Collagen-IV (1:1000, SouthernBiotech 1340), rat anti-mouse CD206 (1:500, Serotec, clone MR5D3), rabbit anti-mouse Iba1 (1:1000, Wako 019-19741), rat anti-mouse CD68 (1:800, Abcam 53444), goat anti-mouse P-selectin (1:1000, RD System AF737), rabbit anti-mouse Aquaporin 4 (sc 20812, Santa Cruz), rabbit anti-mouse Laminin (1:1500, Abcam 11575), rat anti-mouse Ly6G (1:500, clone 1A8, StemCell 60031), rabbit anti-mouse CD3 (1:25, Abcam 5690), rat anti-mouse CD4 (1:25, eBiosciences 14-0042-86) and P2Ry12 (1:500, Anaspec). Primary antibodies were revealed by using Fab'2 fragments of donkey anti-rabbit linked to FITC, anti-rat linked to Cy3, anti-goat IgG linked to Cy5 (1:600, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Fluorescence images were digitally captured using a Leica DM6000 epifluorescence microscope-coupled coolsnap camera, or using a Leica DMI8 microscope equipped with a confocal head Yokogawa CSU-X1 and a Hamamatsu Orca Flash 4.0 camera. This system was controlled by Metamorph software (molecular devices). Images were visualized with Leica MM AF 2.2.0 software (Molecular Devices, USA) and further processed using ImageJ 1.52k software.

Flow Cytometry

After transcardiac perfusion with PBS, brains were roughly minced and homogenized with a potter tissue grinder in Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 15 mM HEPES buffer and 0.54% glucose. Whole brain homogenate was separated by 37% Percoll gradient centrifugation at 800g for 30 min at 4 °C (no brake). The pellet containing CNS leukocytes at the bottom of the tube was then collected and washed once with PBS containing 2% FCS before staining.

Fc receptors were blocked with CD16/32 (553142, BD Biosciences) for 10 min at 4 °C before incubation with the primary antibodies. Cells were stained with antibodies directed against CD11b (M1/70, BioLegend), CD45 (30-F11, BD Biosciences), Ly6G (1A8, BD Biosciences), CD3e (145-2C11, BD Biosciences), CD4 (RM4-5, BD Biosciences), CD8a (53-6.7, BD Biosciences) and CD206 (C068C2, BioLegend) for 45 min at 4 °C. After washing, samples were analyzed by a FACSVerse flow cytometer or sorted by a FACSAria (BD Biosciences). Appropriate isotype control antibodies were used to establish sorting parameters. Data were analyzed with the FlowJo 7.6.5 software (TreeStar Inc.). Data are expressed as percent.

Total RNA extraction

Total RNA was extracted from FACS sorted mouse brain macrophages stabilized in RNAprotect buffer according to the "Purification of total RNA from animal and human cells" protocol of the RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). In brief, cells were stored and shipped in buffer RNAprotect at 2-8 °C. After pelleting by centrifugation for 5 minutes at 5,000 x g, the RNAprotect was replaced by 350 µl buffer RLT Plus and the samples were homogenized by vortexing for 30 seconds. Genomic DNA contamination was removed by using gDNA Eliminator spin columns. Next one volume of 70 % ethanol was added and the samples were applied to RNeasy MinElute spin columns followed by several wash steps. Finally the total RNA was eluted in 12 µl of nuclease free water. Purity and integrity of the RNA was assessed on the Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Pico LabChip reagent set (Agilent, Palo Alto, CA, USA).

RNAseq

The SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing v4 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA) was used to generate first strand cDNA from approximately 500 pg total-RNA. Double stranded cDNA was amplified by LD PCR (13 cycles) and purified *via* magnetic bead clean-up. Library preparation was carried out as described in the Illumina Nextera XT Sample Preparation Guide (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Thereby 150 pg of input cDNA were tagmented (tagged and fragmented) by the Nextera XT transposome. The products were purified and amplified *via* a limited-

cycle PCR program to generate multiplexed sequencing libraries. For the PCR step 1:5 dilutions of the unique dual indexing (i7 and I5) adapters were used. The libraries were quantified using the KAPA Library Quantification Kit - Illumina/ABI Prism User Guide (Roche Sequencing Solutions, Inc., Pleasanton, CA, USA). Equimolar amounts of each library were sequenced on an Illumina NextSeq 2000 instrument controlled by the NextSeq 2000 Control Software (NCS) v1.2.0.36376, using two 100 cycles P2 Flow Cell with the dual index, single-read (SR) run parameters. Image analysis and base calling were done by the Real Time Analysis Software (RTA) v3.7.17. The resulting .cbcl files were converted into .fastq files with the bcl2fastq v2.20 software. RNA extraction, library preparation and RNAseq were performed at the Genomics Core Facility "KFB - Center of Excellence for Fluorescent Bioanalytics" (University of Regensburg, Regensburg, Germany; www.kfb-regensburg.de).

RNAseq analysis

The GSEA analysis was started on the Gene sets derived from the GO Biological Process ontology (BP) database using the ClusterProfiler package, gseGO function. Then the Simplify function was used *via* GOSemSim to eliminate the redundant GO terms (Yu *et al.,* 2012).

ClueGO is a Cytoscape plug-in that visualizes the non-redundant biological terms for large clusters of genes in a functionally grouped network.ClueGO performs single cluster analysis and comparison of several clusters (lists of genes). From the ontology sources used, the terms are selected by different filter criteria. The related terms which share similar associated genes can be fused to reduce redundancy. The ClueGO network is created with kappa statistics and reflects the relationships between the terms based on the similarity of their associated genes (Bindea *et al*., 2009).

Statistical analyses

Results are the mean ± SEM. Statistical analyses were performed using the Graphpad Prism 9.0 software. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality. Proportions were compared using the chi-square or Fisher test, while the continuous variables between groups were compared with the Student´s t or the Mann-Whitney test depending on whether their distribution was normal or not. Mann-Whitney test was used when independent experiments were compared between two groups.

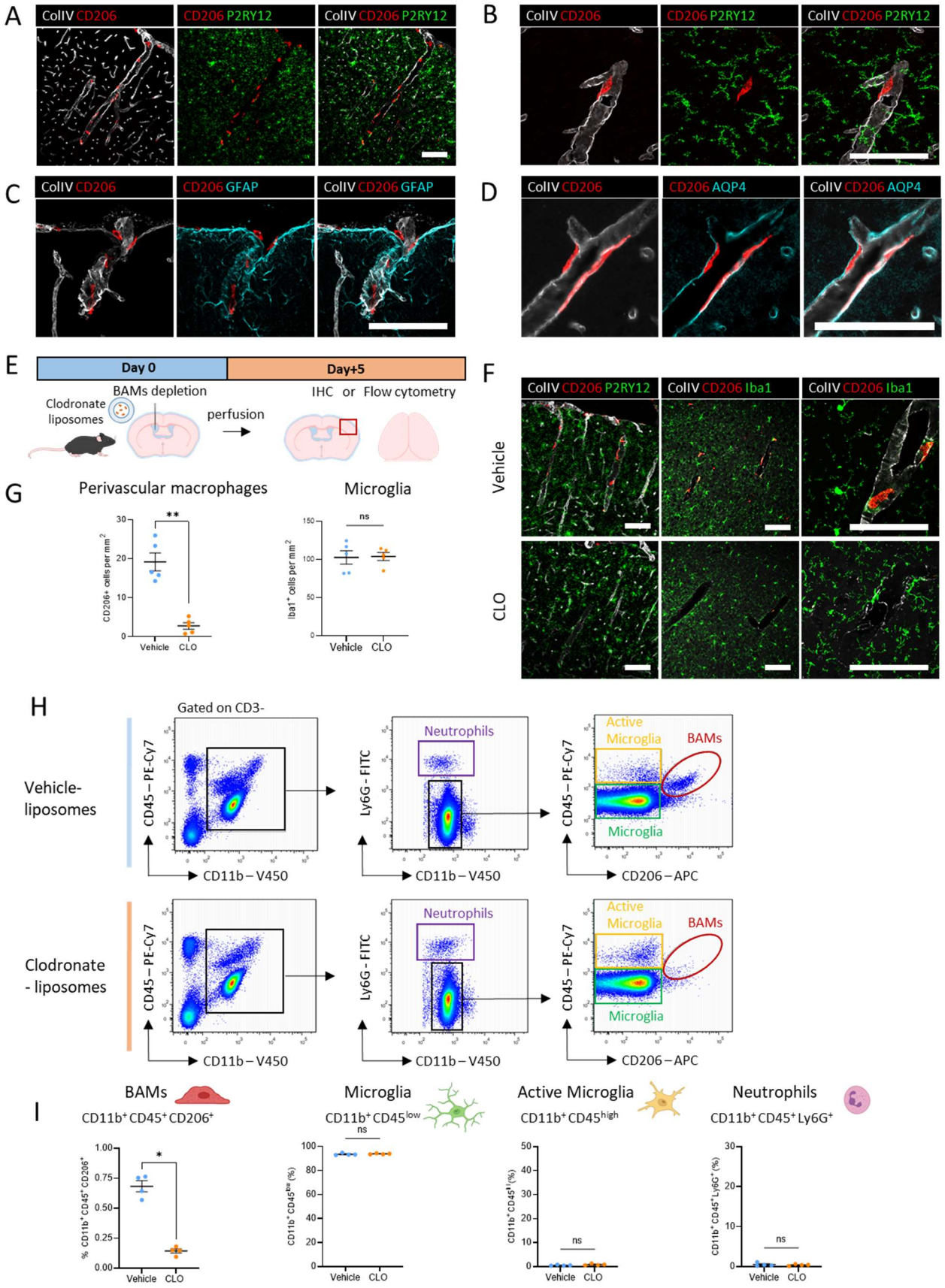

A
ColIV CD206
CD206 P2RY12
ColIV CD206 P2RY12
B
ColIV CD206
CD206 P2RY12
ColIV CD206 P2RY12
C
ColIV CD206
CD206 GFAP
ColIV CD206 GFAP
D
ColIV CD206
CD206 AQP4
ColIV CD206 AQP4
E
Day 0
Day+5
BAMs depletion
IHC or Flow cytometry
Clodronate liposomes
perfusion
F
ColIV CD206 P2RY12
ColIV CD206 Iba1
ColIV CD206 Iba1
Vehicle
CLO
G
Perivascular macrophages
Microglia
CD206+ cells per mm2
Iba1+ cells per mm2
**
ns
Vehicle
CLO
H
Gated on CD3-
Vehicle-liposomes
Clodronate - liposomes
CD45 – PE-Cy7
CD11b – V450
Ly6G - FITC
CD206 – APC
Neutrophils
Active Microglia
BAMs
Microglia
I
BAMs
CD11b+ CD45+ CD206+
Microglia
CD11b+ CD45low
Active Microglia
CD11b+ CD45high
Neutrophils
CD11b+ CD45+ Ly6G+
*
ns
Vehicle
CLO

FIGURE 1

Figure 1: Immunohistological description of border-associated macrophages in the mouse brain, and characterization of their depletion by intracerebroventricular injection of clodronate-liposomes. A) Representative immunofluorescence images of CD206$^+$ border-associated macrophages (BAMs) (red), P2RY12$^+$ microglia (green) and collagen IV in the basal lamina of blood vessels (gray) in mice brain cortex. Scale bar: 100 µm. **B**) Representative immunofluorescence images of CD206$^+$ BAMs (red), P2RY12$^+$ microglia (green) and collagen IV in the basal lamina of blood vessels (gray) in mice brain cortex. Scale bar: 100 µm **C**) Representative immunofluorescence images of CD206$^+$ BAMs (red), GFAP$^+$ astrocytes (cyan) and collagen IV in the basal lamina of blood vessels (gray) in mice brain cortex. Scale bar: 100 µm. **D**) Representative immunofluorescence images of CD206$^+$ BAMs (red), AQP4$^+$ astrocytes endfeet (cyan) and collagen IV in the basal lamina of blood vessels (gray) in mice brain cortex. Scale bar: 100 µm. **E**) Schematic representation of the experimental protocol for BAMs depletion and quantification. **F**) Representative immunofluorescence images of CD206$^+$ BAMs (red), Iba1$^+$ microglia (green) and collagen IV in the basal lamina of blood vessels (gray), in vehicle or clodronate-liposomes treated mice cortex. Scale bar: 100 µm. **G**) Immunohistological quantification of CD206$^+$ perivascular macrophages (PVMs) and Iba1$^+$ microglia in vehicle or clodronate-liposomes treated mice cortex. n=5, * $p<0.05$, Mann-Whitney U test. **H**) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of BAMs, microglia, active microglia and neutrophils from mice brain treated with vehicle or clodronate-liposomes. **I**) Flow cytometry quantification of BAMs, microglia, active microglia and neutrophils from mice brain treated with vehicle or clodronate-liposomes. n=4, * $p<0.05$, Mann-Whitney U test.

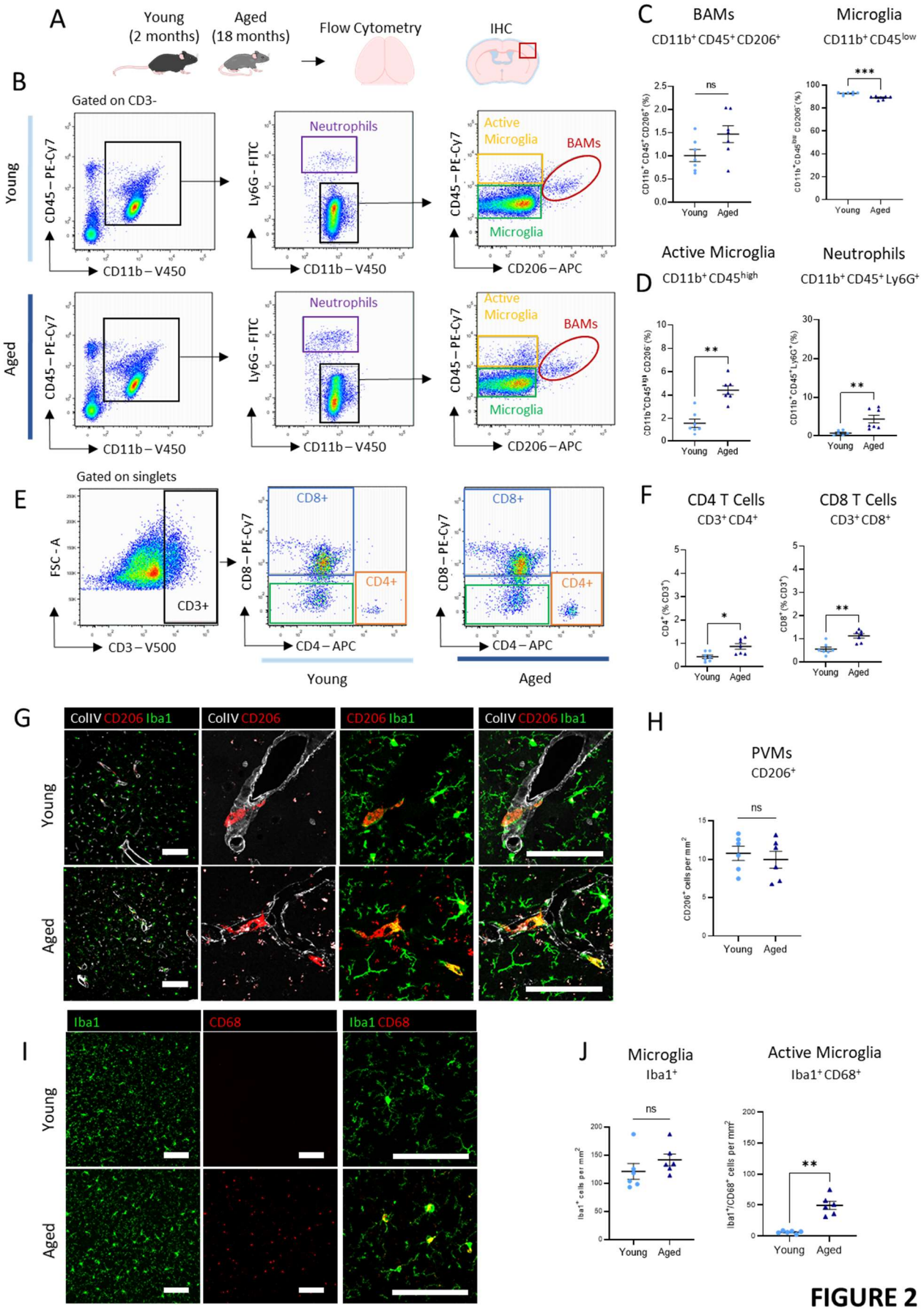

A
Young (2 months)
Aged (18 months)
Flow Cytometry
IHC
B
Gated on CD3-
Young
Aged
CD45 – PE-Cy7
CD11b – V450
Ly6G - FITC
Neutrophils
Active Microglia
BAMs
Microglia
CD206 – APC
C
BAMs
CD11b+ CD45+ CD206+
Microglia
CD11b+ CD45low
ns
***
Young
Aged
D
Active Microglia
CD11b+ CD45high
Neutrophils
CD11b+ CD45+ Ly6G+
**
E
Gated on singlets
FSC - A
CD3+
CD3 – V500
CD8 – PE-Cy7
CD8+
CD4+
CD4 – APC
F
CD4 T Cells
CD3+ CD4+
CD8 T Cells
CD3+ CD8+
*
G
CollV CD206 Iba1
CollV CD206
CD206 Iba1
H
PVMs
CD206+
I
Iba1
CD68
Iba1 CD68
J
Microglia
Iba1+
Active Microglia
Iba1+ CD68+

FIGURE 2

Figure 2: Inflammatory priming in the brain of aged mice, with no apparent change in the BAMs population. A) Schematic representation of the experimental protocol for immune cells quantification in young or aged mice brain. **B**) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of BAMs, microglia, active microglia and neutrophils from young or aged mice brain. **C, D**) Flow cytometry quantification of BAMs, microglia, active microglia and neutrophils from young or aged mice brain. n=7, ** $p<0.01$, ***$p<0.001$ Mann-Whitney U test. **E**) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of T cells from young or aged mice brain. **F**) Flow cytometry quantification of T cells from young or aged mice brain. n=7, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Mann-Whitney U test. **G**) Representative immunofluorescence images of $CD206^+$ BAMs (red), $Iba1^+$ microglia (green) and collagen IV in the basal lamina of blood vessels (gray) in young or aged mice brain cortex. Scale bar: 100 µm. **H**) Immunohistological quantification of $CD206^+$ perivascular macrophages in young or aged mice brain cortex. n=6, * $p<0.05$, Mann-Whitney U test. **I**) Representative immunofluorescence images of $Iba1^+$ microglia (green) and $CD68^+$ macrophage/active microglia (red) in young or aged mice brain cortex. Scale bar: 100 µm**. J**) Immunohistological quantification of $Iba1^+$ microglia and $Iba1^+/CD68^+$ active microglia in young or aged mice brain cortex. n=6, ** $p<0.01$, Mann-Whitney U test.

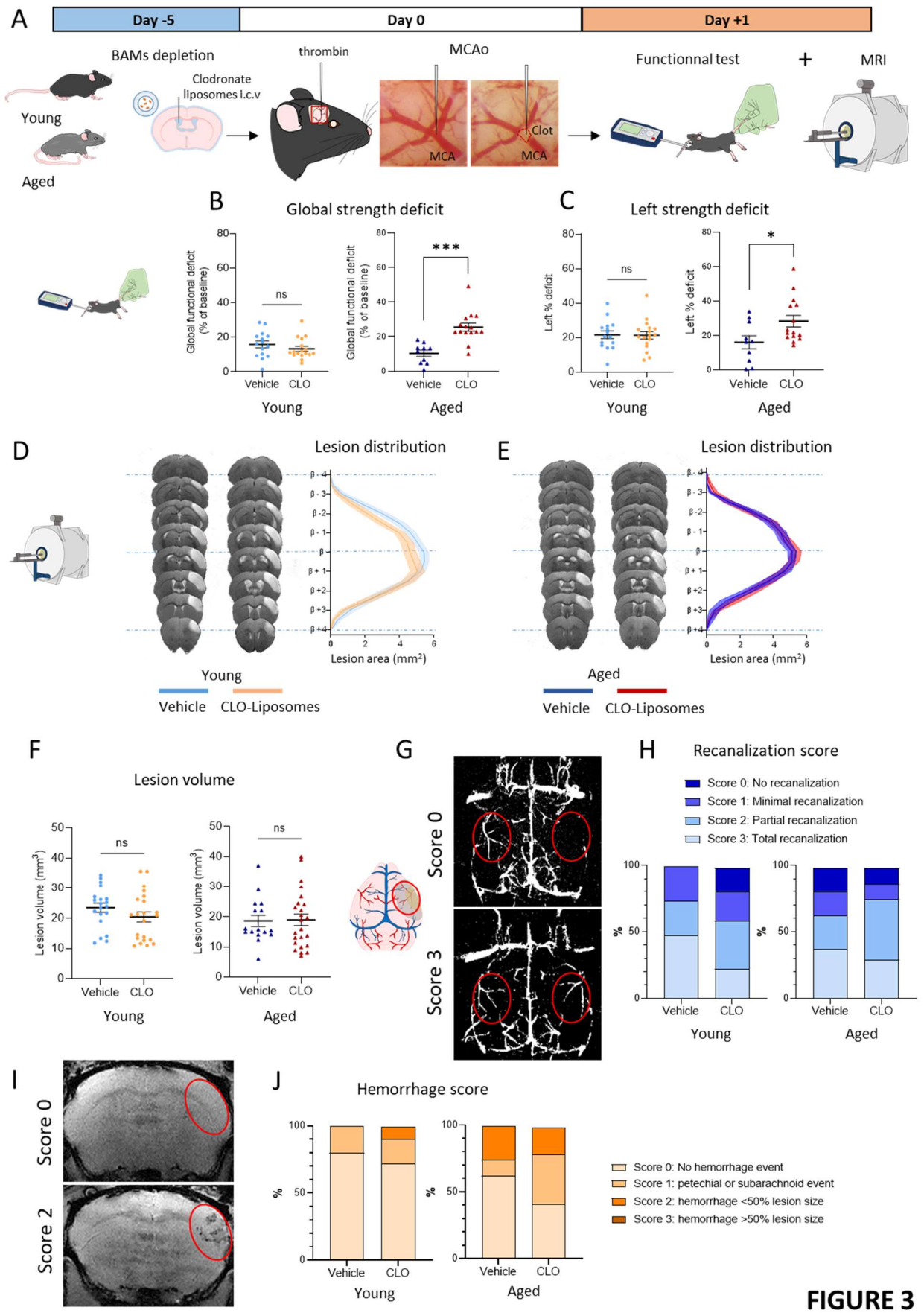

A
Day -5
Day 0
Day +1
BAMs depletion
Young
Aged
Clodronate liposomes i.c.v
thrombin
MCAo
MCA
Clot
MCA
Functionnal test
+
MRI
B
Global strength deficit
Global functional deficit (% of baseline)
ns
***
Vehicle
CLO
Young
Aged
C
Left strength deficit
Left % deficit
ns
*
Vehicle
CLO
Young
Aged
D
Lesion distribution
Lesion area (mm²)
Young
Vehicle
CLO-Liposomes
E
Lesion distribution
Lesion area (mm²)
Aged
Vehicle
CLO-Liposomes
F
Lesion volume
Lesion volume (mm³)
ns
ns
Vehicle
CLO
Young
Aged
G
Score 0
Score 3
H
Recanalization score
Score 0: No recanalization
Score 1: Minimal recanalization
Score 2: Partial recanalization
Score 3: Total recanalization
%
Vehicle
CLO
Young
Aged
I
Score 0
Score 2
J
Hemorrhage score
%
Vehicle
CLO
Young
Aged
Score 0: No hemorrhage event
Score 1: petechial or subarachnoid event
Score 2: hemorrhage <50% lesion size
Score 3: hemorrhage >50% lesion size

FIGURE 3

Figure 3: BAMs depletion increases functional deficit after stroke in aged mice but not in young mice. A) Schematic representation of the experimental protocol. **B**) Quantification of the global strength deficit measured by grip test at 24 hours after stroke onset in vehicle or clodronate-treated young (left) or aged (right) mice. n=20 vehicle, young /n=22 clodronate, young /n=16 vehicle, aged /n=24 clodronate, aged; *** $p<0.001$; Mann-Whitney U test. **C**) Quantification of the specific left paw strength deficit measured by grip test at 24 hours after stroke onset in vehicle or clodronate-treated young (left) or aged (right) mice. n=20 vehicle, young /n=22 clodronate, young /n=16 vehicle, aged /n=24 clodronate, aged; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test. **D**) Representative T2-weighted MRI brain images of the ischemic lesion at 24 hours after stroke (left) and representation of the lesion distribution around the bregma (right) in vehicle or clodronate-treated young and **E**) aged mice. **F**) Quantification of ischemic lesion volume at 24 hours after stroke in vehicle or clodronate-treated young (left) or aged (right) mice. n=20 vehicle, young /n=22 clodronate, young /n=16 vehicle, aged /n=24 clodronate, aged. Mann-Whitney U test. **G**) Representative 3D-reconstructed angiographies illustrating recanalization score 0 (top) or score 3 (bottom) after stroke. **H**) Percentage of recanalization score at 24 hours after stroke onset in vehicle or clodronate-treated young (left) or aged (right) mice. n=20 vehicle, young /n=22 clodronate, young /n=16 vehicle, aged /n=24 clodronate, aged. Score 0 = complete occlusion; Score 1 = incomplete filling of the distal territory; Score 2 = almost complete filling of the distal territory; Score 3 = complete recanalization. **I**) Representative T2* weighted MRI brain images illustrating hemorrhage score 0 (top) or score 3 (bottom) after stroke. **J**) Percentage of hemorrhage score at 24 hours after stroke onset in vehicle or clodronate-treated young (left) or aged (right) mice. n=20 vehicle, young /n=22 clodronate, young /n=16 vehicle, aged /n=24 clodronate, aged. Score 0 = no hemorrhage event; Score 1 = petechial (small bleeding spots from small bleeding areas) or subarachnoid event; Score 2 = hemorrhage <50% of the lesion size; Score 3 = hemorrhage >50% of the lesion size (not observed).

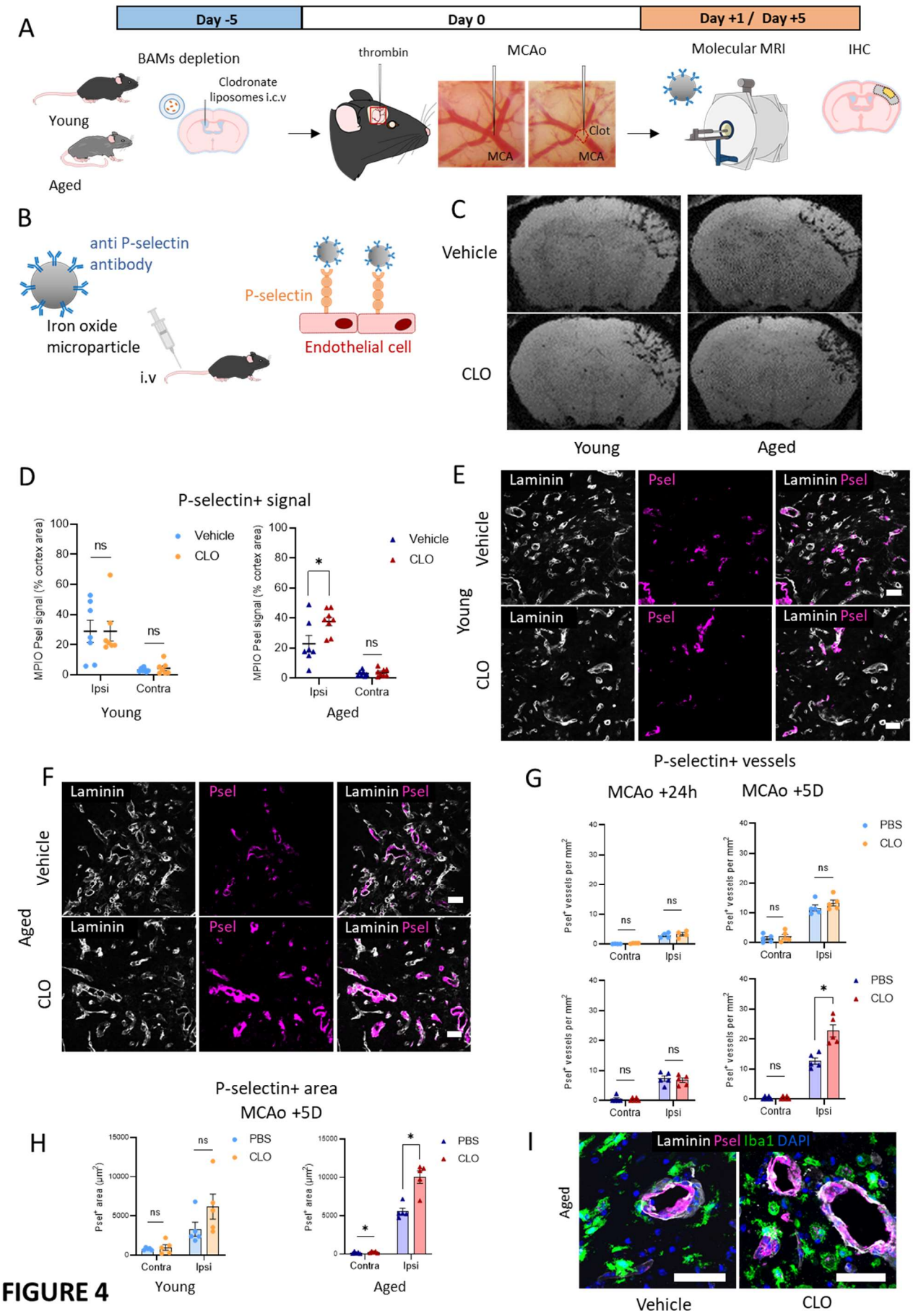

A
Day -5
Day 0
Day +1 / Day +5
BAMs depletion
Clodronate liposomes i.c.v
Young
Aged
thrombin
MCAo
MCA
Clot
Molecular MRI
IHC
B
anti P-selectin antibody
Iron oxide microparticle
i.v
P-selectin
Endothelial cell
C
Vehicle
CLO
Young
Aged
D
P-selectin+ signal
MPIO Psel signal (% cortex area)
Vehicle
CLO
ns
*
Ipsi
Contra
Young
Aged
E
Laminin
Psel
Laminin Psel
Vehicle
CLO
Young
F
Aged
G
P-selectin+ vessels
MCAo +24h
MCAo +5D
Psel+ vessels per mm2
PBS
CLO
H
P-selectin+ area
MCAo +5D
Psel+ area (µm2)
I
Laminin Psel Iba1 DAPI
Vehicle
CLO

FIGURE 4

Figure 4: BAMs depletion increases the expression of the P-selectin adhesion molecule after stroke in aged mice but not in young mice. A) Schematic representation of the experimental protocol. **B**) Schematic representation of microparticles of iron oxide (MPIOs) coupled to anti-P-selectin antibodies to reveal vascular inflammation by magnetic resonance imaging (MRI). **C**) Representative T2*-weighted MRI brain images of the MPIOs signal at 24 hours after stroke in vehicle or clodronate-treated young and aged mice. **D**) Quantification of MPIOs hyposignal in the cortex. n=7 vehicle, young /n=7 clodronate, young /n=7 vehicle, aged /n=8 clodronate, aged. * $p<0.05$, Mann-Whitney U test. **E**) Representative immunofluorescence images of $Psel^+$ blood vessels in mice brain cortex at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice. Scale bar: 50 µm. **F**) Representative immunofluorescence images of $Psel^+$ blood vessels in mice brain cortex at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice. Scale bar: 50 µm. **G**) Immunohistological quantification of the number of $Psel^+$ blood vessels in mice brain cortex at 24 hours/5 days after stroke. n=5; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test. **H**) Immunohistological quantification of the $Psel^+$ area in mice brain cortex at 5 days after stroke. n=5; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test. **I**) Immunofluorescence images of $Psel^+$ (magenta) blood vessels (gray) and $Iba1^+$ microglia (green) in mice brain cortex at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice. Scale bar: 50 µm.

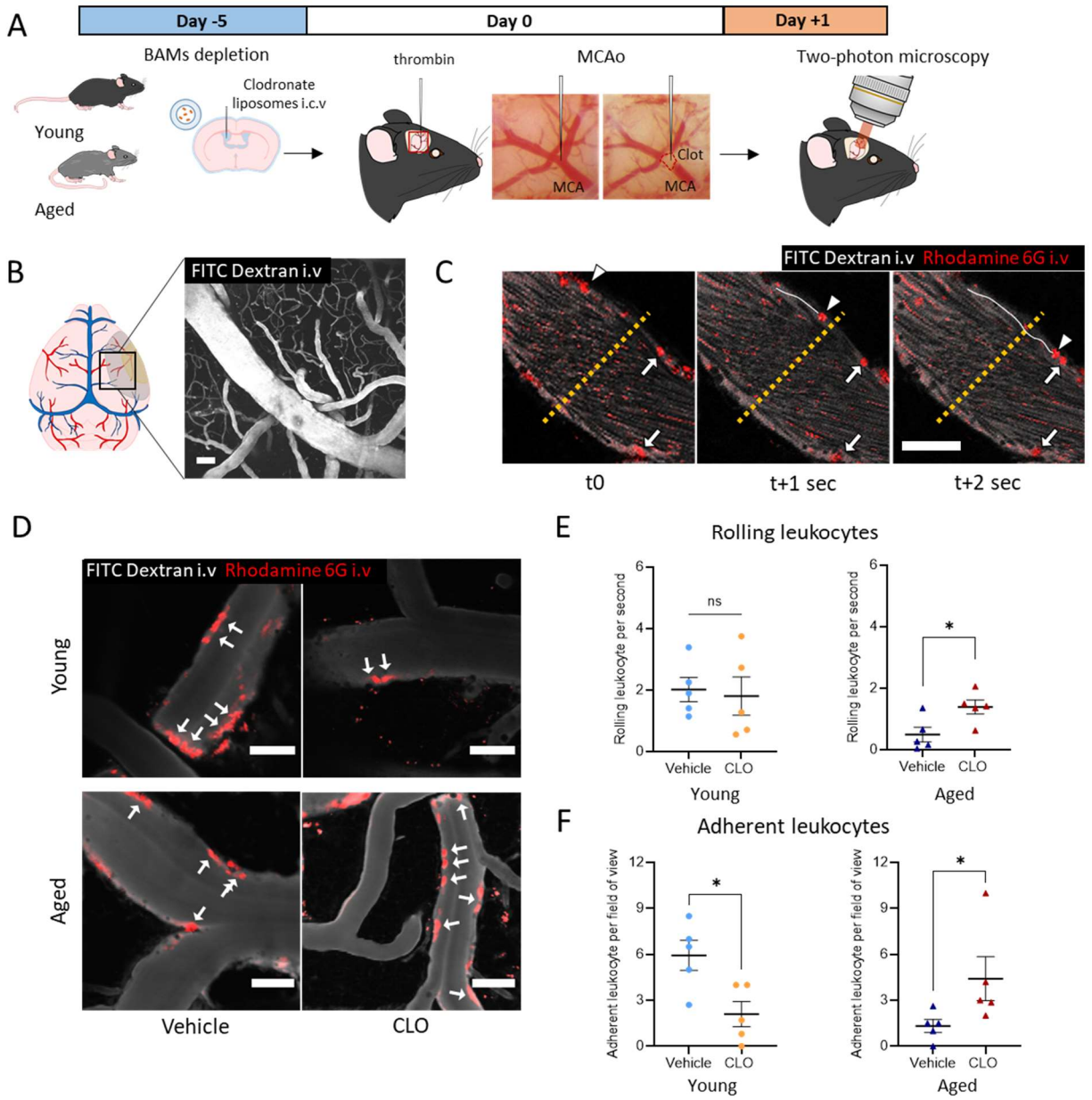

A
Day -5
Day 0
Day +1
BAMs depletion
thrombin
MCAo
Two-photon microscopy
Clodronate liposomes i.c.v
Young
Aged
MCA
Clot
MCA
B
FITC Dextran i.v
C
FITC Dextran i.v Rhodamine 6G i.v
t0
t+1 sec
t+2 sec
D
FITC Dextran i.v Rhodamine 6G i.v
Young
Aged
Vehicle
CLO
E
Rolling leukocytes
Rolling leukocyte per second
ns
*
Vehicle CLO
Young
Aged
F
Adherent leukocytes
Adherent leukocyte per field of view
*
Vehicle CLO
Young
Aged

FIGURE 5

Figure 5: BAMs depletion differentially modulates leukocyte trafficking in cerebral vessels after stroke. A) Schematic representation of the experimental protocol. **B**) Left: schematic view of the brain seen from above, the shaded area corresponds to the ischemic area, the black square represents the imaging area through the thinned cranial window. Right: Two-photon z-projection of cortical blood vessels labelled with intravenously injected FITC-Dextran 70kDa (gray). Scale bar: 50 µm. **C**) Time-lapse images acquired with two-photon microscope, illustrating the quantification of rolling leukocytes using the kymograph plugin. Circulating leukocytes are labelled with intravenously injected Rhodamine-6G (red). The yellow dotted line represents the kymograph line in order to quantify the number of leukocytes passing through it. The white arrowhead shows a leukocyte rolling on the vessel wall. The white line represents its path between t0 and t + 2sec. White arrows show adherent leukocytes, which do not move between t0 and t + 2sec. Scale bar: 50 µm. **D**) Representative compilation images of 2 minutes time-lapse showing leukocyte adhesion to the walls of cerebral vessels 24 hours after stroke. White arrows show adherent leukocytes. Scale bar: 50 µm. **E**) Quantification of leukocyte rolling 24 hours after stroke in vehicle or clodronate-treated young and aged mice. n=5; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test. **F**) Quantification of leukocyte adhesion 24 hours after stroke in vehicle or clodronate-treated young and aged mice. n=5; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test.

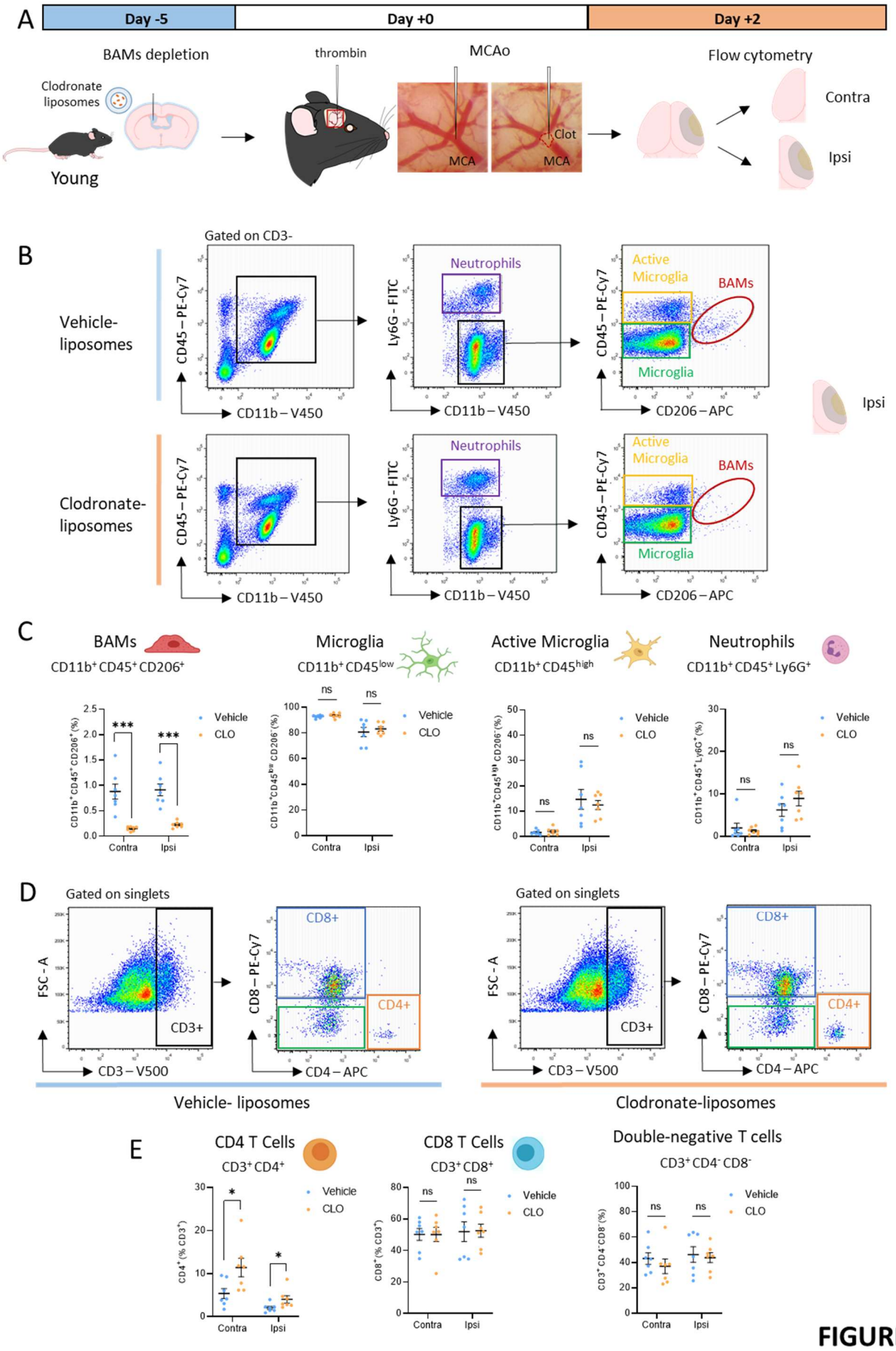

A
Day -5
Day +0
Day +2
BAMs depletion
Clodronate liposomes
Young
thrombin
MCAo
MCA
Clot
MCA
Flow cytometry
Contra
Ipsi
B
Gated on CD3-
Vehicle-liposomes
Clodronate-liposomes
CD45 – PE-Cy7
CD11b – V450
Ly6G - FITC
Neutrophils
Active Microglia
BAMs
Microglia
CD206 – APC
Ipsi
C
BAMs
CD11b+ CD45+ CD206+
Microglia
CD11b+ CD45low
Active Microglia
CD11b+ CD45high
Neutrophils
CD11b+ CD45+ Ly6G+
Vehicle
CLO
Contra
Ipsi
ns
***
D
Gated on singlets
FSC - A
CD3 – V500
CD3+
CD8 – PE-Cy7
CD4 – APC
CD8+
CD4+
Vehicle- liposomes
Clodronate-liposomes
E
CD4 T Cells
CD3+ CD4+
CD8 T Cells
CD3+ CD8+
Double-negative T cells
CD3+ CD4- CD8-
Vehicle
CLO
Contra
Ipsi
ns
*

FIGURE 6

Figure 6: BAMs depletion increases CD4$^+$ T cells infiltration 2 days after stroke in young mice. A) Schematic representation of the experimental protocol. **B**) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of BAMs, microglia, active microglia and neutrophils 2 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice brain. **C**) Flow cytometry quantification of BAMs, microglia, active microglia and neutrophils 2 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice brain. n=7; *** $p<0.001$; Mann-Whitney U test. **D**) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of T cells 2 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice brain. **E**) Flow cytometry quantification of T cells 2 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice brain. n=7; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test.

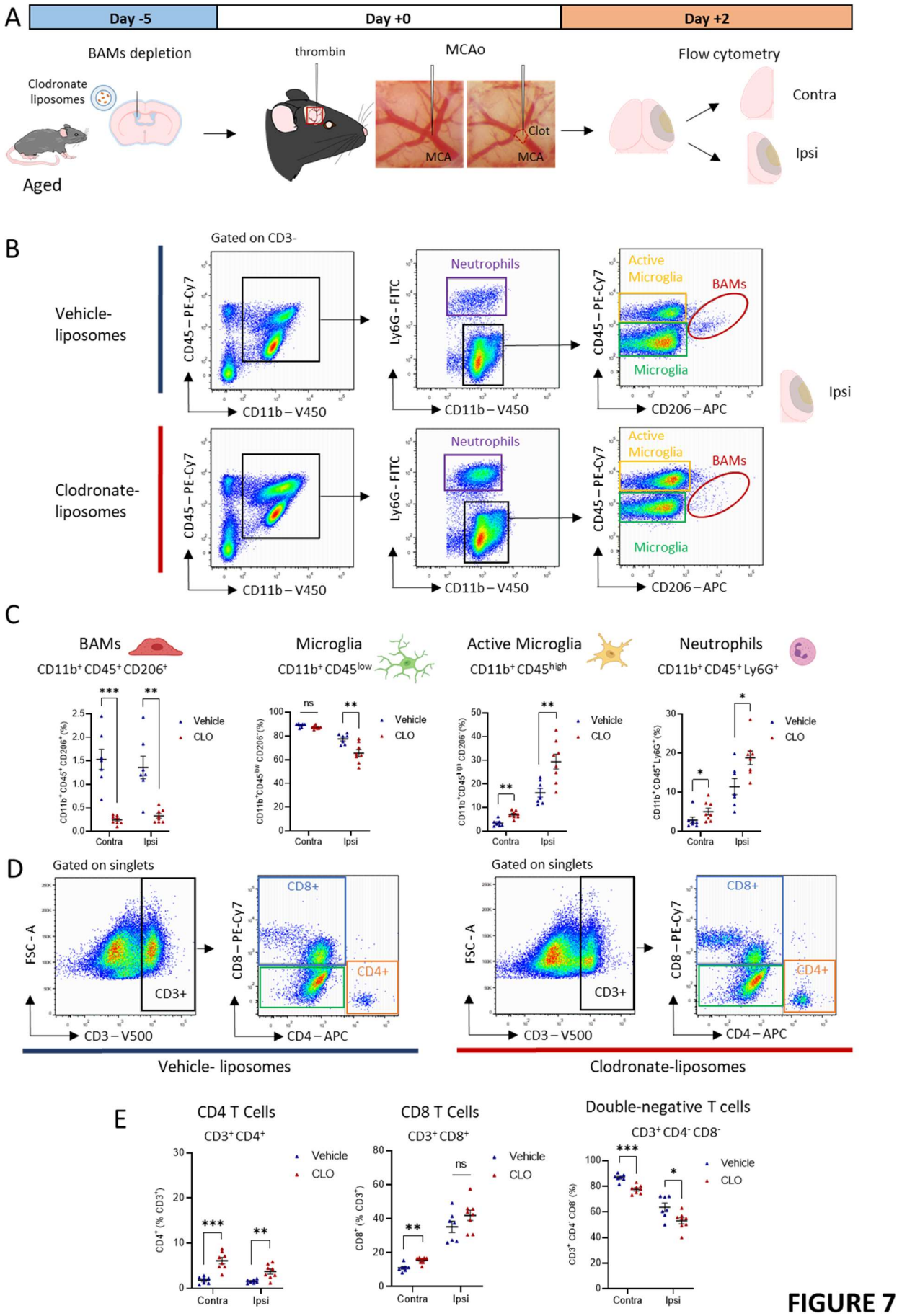

A
Day -5
Day +0
Day +2
BAMs depletion
Clodronate liposomes
Aged
thrombin
MCAo
MCA
Clot
MCA
Flow cytometry
Contra
Ipsi
B
Gated on CD3-
Vehicle-liposomes
Clodronate-liposomes
CD45 – PE-Cy7
CD11b – V450
Ly6G - FITC
Neutrophils
Active Microglia
BAMs
Microglia
CD206 – APC
Ipsi
C
BAMs
CD11b+ CD45+ CD206+
Microglia
CD11b+ CD45low
Active Microglia
CD11b+ CD45high
Neutrophils
CD11b+ CD45+ Ly6G+
Vehicle
CLO
Contra
Ipsi
ns
D
Gated on singlets
FSC - A
CD3 – V500
CD3+
CD8 – PE-Cy7
CD4 – APC
CD8+
CD4+
Vehicle- liposomes
Clodronate-liposomes
E
CD4 T Cells
CD3+ CD4+
CD8 T Cells
CD3+ CD8+
Double-negative T cells
CD3+ CD4- CD8-

FIGURE 7

Figure 7: BAMs depletion increases microglial activation and neutrophils, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells infiltration 2 days after stroke in aged mice. A) Schematic representation of the experimental protocol. **B**) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of BAMs, microglia, active microglia and neutrophils 2 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice brain. **C**) Flow cytometry quantification of BAMs, microglia, active microglia and neutrophils 2 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice brain. n=7; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; Mann-Whitney U test. **D**) Representative flow cytometry dot-plots and gating strategy used for quantification of T cells 2 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice brain. **E**) Flow cytometry quantification of T cells 2 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice brain. n=7; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; Mann-Whitney U test.

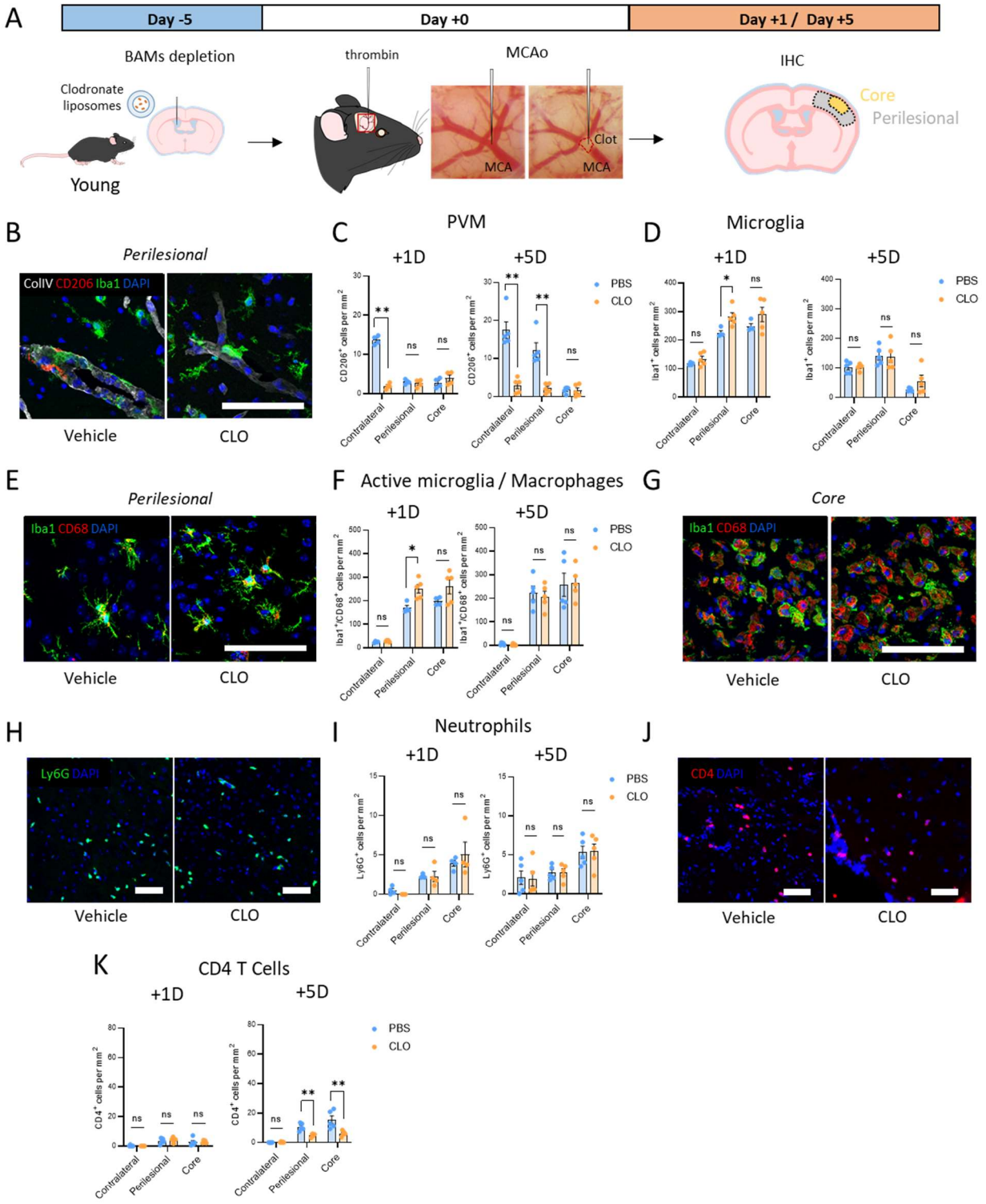

A
Day -5
Day +0
Day +1 / Day +5
BAMs depletion
Clodronate liposomes
Young
thrombin
MCAo
MCA
Clot
MCA
IHC
Core
Perilesional
B
Perilesional
CollV CD206 Iba1 DAPI
Vehicle
CLO
C
PVM
+1D
+5D
PBS
CLO
CD206+ cells per mm2
Contralateral
Perilesional
Core
D
Microglia
+1D
+5D
Iba1+ cells per mm2
E
Perilesional
Iba1 CD68 DAPI
Vehicle
CLO
F
Active microglia / Macrophages
+1D
+5D
Iba1+/CD68+ cells per mm2
G
Core
Iba1 CD68 DAPI
Vehicle
CLO
H
Ly6G DAPI
Vehicle
CLO
I
Neutrophils
+1D
+5D
Ly6G+ cells per mm2
J
CD4 DAPI
Vehicle
CLO
K
CD4 T Cells
+1D
+5D
CD4+ cells per mm2

FIGURE 8

Figure 8: Immunohistological characterization of stroke-induced inflammation 1 day and 5 days after stroke in vehicle and clodronate-treated young mice. A) Schematic representation of the experimental protocol. **B**) Representative immunofluorescence images of $CD206^+$ PVMs and $Iba1^+$ microglia in brain cortex at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice. Scale bar: 100 µm. C) Immunohistological quantification of $CD206^+$ PVMs 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; ** $p<0.01$; Mann-Whitney U test. **D**) Immunohistological quantification of $Iba1^+$ microglia 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; Mann-Whitney U test. **E**) Representative immunofluorescence images of $Iba1^+/CD68^+$ active microglia in perilesional area 1 day after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice. Scale bar: 100 µm. **F**) Immunohistological quantification of $Iba1^+/CD68^+$ active microglia/macrophages 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test. **G**) Representative immunofluorescence images of $Iba1^+/CD68^+$ microglia/macrophages in ischemic core at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice. Scale bar: 100 µm. **H**) Representative immunofluorescence images of $Ly6G^+$ neutrophils in brain cortex at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice. **I**) Immunohistological quantification of $Ly6G^+$ neutrophils 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5. **J**) Representative immunofluorescence images of $CD4^+$ T cells in brain cortex at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated young mice. **K**) Immunohistological quantification of $CD4^+$ T cells 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; ** $p<0.01$; Mann-Whitney U test.

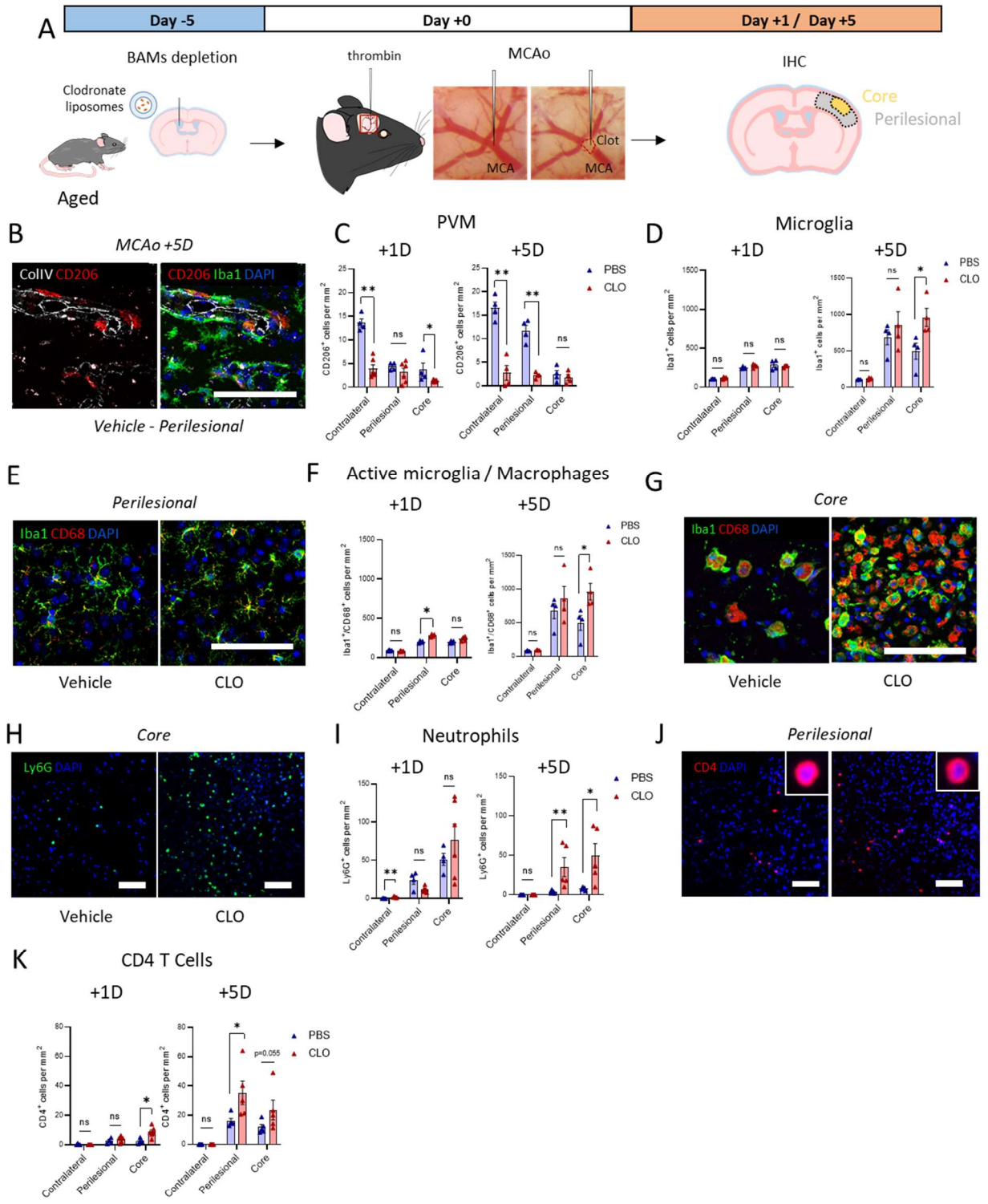

A
Day -5
Day +0
Day +1 / Day +5
BAMs depletion
Clodronate liposomes
Aged
thrombin
MCAo
MCA
Clot
MCA
IHC
Core
Perilesional
B
MCAo +5D
CollV CD206
CD206 Iba1 DAPI
Vehicle - Perilesional
C
PVM
+1D
+5D
PBS
CLO
Contralateral
Perilesional
Core
D
Microglia
+1D
+5D
E
Perilesional
Iba1 CD68 DAPI
Vehicle
CLO
F
Active microglia / Macrophages
+1D
+5D
G
Core
Iba1 CD68 DAPI
Vehicle
CLO
H
Core
Ly6G DAPI
Vehicle
CLO
I
Neutrophils
+1D
+5D
J
Perilesional
CD4 DAPI
K
CD4 T Cells
+1D
+5D
p=0.055

FIGURE 9

Figure 9: Immunohistological characterization of stroke-induced inflammation 1 day and 5 days after stroke in vehicle and clodronate-treated aged mice. A) Schematic representation of the experimental protocol. **B**) Representative immunofluorescence images of $CD206^+$ PVMs and $Iba1^+$ microglia in perilesional area at 5 days after stroke in vehicle aged mice. Scale bar: 100 µm. **C**) Immunohistological quantification of $CD206^+$ PVMs 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; Mann-Whitney U test. **D**) Immunohistological quantification of $Iba1^+$ microglia 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test. **E**) Representative immunofluorescence images of $Iba1^+/CD68^+$ active microglia in perilesional area at 1 day after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice. Scale bar: 100 µm. **F**) Immunohistological quantification of $Iba1^+/CD68^+$ active microglia 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test. **G**) Representative immunofluorescence images of $Iba1^+/CD68^+$ microglia/macrophages in ischemic core at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice. Scale bar: 100 µm. **H**) Representative immunofluorescence images of $Ly6G^+$ neutrophils in brain cortex at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice. **I**) Immunohistological quantification of $Ly6G^+$ neutrophils 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; * $p<0.05$; **$p<0.01$; Mann-Whitney U test. **J**) Representative immunofluorescence images of $CD4^+/CD8^+$ T cells in brain cortex at 5 days after stroke in vehicle or clodronate-treated aged mice. Scale bar: 100 µm. **K**) Immunohistological quantification of $CD4^+$ T cells 1 day (left) and 5 days (right) after stroke. n=5; * $p<0.05$; Mann-Whitney U test.

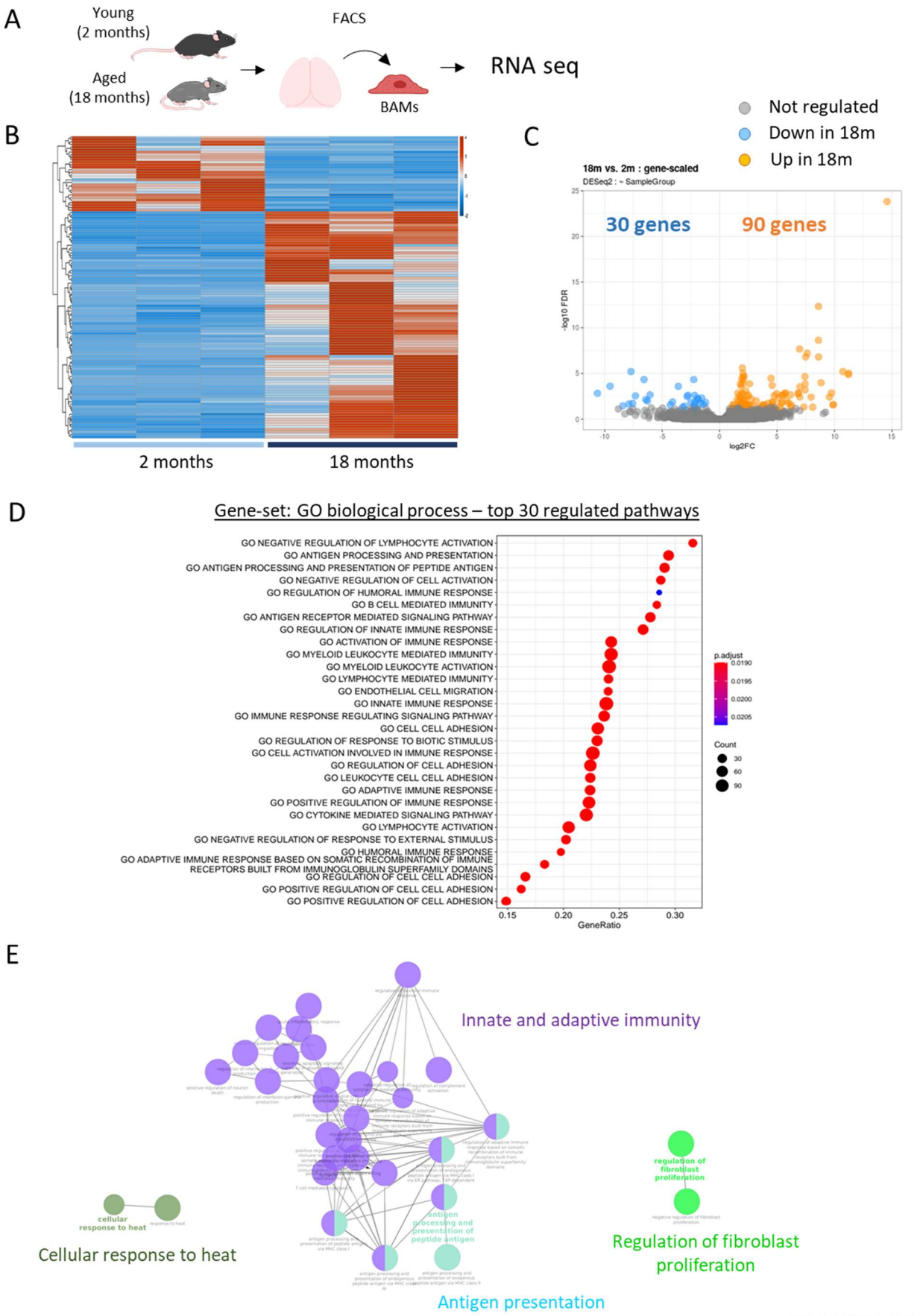

A
Young
(2 months)
Aged
(18 months)
FACS
BAMs
RNA seq
B
2 months
18 months
C
Not regulated
Down in 18m
Up in 18m
18m vs. 2m : gene-scaled
DESeq2 : ~ SampleGroup
30 genes
90 genes
-log10 FDR
log2FC
D
Gene-set: GO biological process – top 30 regulated pathways
GO NEGATIVE REGULATION OF LYMPHOCYTE ACTIVATION
GO ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION
GO ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION OF PEPTIDE ANTIGEN
GO NEGATIVE REGULATION OF CELL ACTIVATION
GO REGULATION OF HUMORAL IMMUNE RESPONSE
GO B CELL MEDIATED IMMUNITY
GO ANTIGEN RECEPTOR MEDIATED SIGNALING PATHWAY
GO REGULATION OF INNATE IMMUNE RESPONSE
GO ACTIVATION OF IMMUNE RESPONSE
GO MYELOID LEUKOCYTE MEDIATED IMMUNITY
GO MYELOID LEUKOCYTE ACTIVATION
GO LYMPHOCYTE MEDIATED IMMUNITY
GO ENDOTHELIAL CELL MIGRATION
GO INNATE IMMUNE RESPONSE
GO IMMUNE RESPONSE REGULATING SIGNALING PATHWAY
GO CELL CELL ADHESION
GO REGULATION OF RESPONSE TO BIOTIC STIMULUS
GO CELL ACTIVATION INVOLVED IN IMMUNE RESPONSE
GO REGULATION OF CELL ADHESION
GO LEUKOCYTE CELL CELL ADHESION
GO ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE
GO POSITIVE REGULATION OF IMMUNE RESPONSE
GO CYTOKINE MEDIATED SIGNALING PATHWAY
GO LYMPHOCYTE ACTIVATION
GO NEGATIVE REGULATION OF RESPONSE TO EXTERNAL STIMULUS
GO HUMORAL IMMUNE RESPONSE
GO ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE BASED ON SOMATIC RECOMBINATION OF IMMUNE RECEPTORS BUILT FROM IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY DOMAINS
GO REGULATION OF CELL CELL ADHESION
GO POSITIVE REGULATION OF CELL CELL ADHESION
GO POSITIVE REGULATION OF CELL ADHESION
GeneRatio
p.adjust
Count
E
Innate and adaptive immunity
Cellular response to heat
Regulation of fibroblast proliferation
Antigen presentation

FIGURE 10

Figure 10: BAMs change their transcriptomic phenotype during aging and overexpress genes implicated in the regulation of cell adhesion, regulation of both innate and adaptive immune responses and cytokine-mediated signaling pathways. A) Schematic representation of the experimental protocol to isolate $CD11b^+$ $CD45^+$ $CD206^+$ BAMs by fluorescence activated cell sorting (FACS) from young and aged mice brain to analyse the RNA expression profile. **B**) Heatmap of differentially expressed genes determined by whole-transcriptome RNA-seq of BAMs from young and aged mice brain. Normalized Z score values (high, red; low, blue) were calculated for each differentially expressed gene. **C**) Volcano plot showing significantly differentiated genes (upregulated, orange; downregulated, blue). **D**) Dotplot representing the 30 most upregulated pathways according to the gene set enrichment analysis (GSEA) analysis from the Biological Process ontology. **E**) Clustering of significantly regulated GO biological process pathways. Pathways are grouped into four clusters: the "T-cell mediated immunity" cluster (purple), the "antigen presentation" cluster (turquoise), the "cellular response to heat" cluster (khaki), and the "regulation of fibroblast proliferation" cluster (light green).

Alves de Lima, K., Rustenhoven, J. and Kipnis, J. (2020) 'Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease', Annual Review of Immunology, 38(1), pp. 597–620. doi:10.1146/annurev-immunol-102319-103410.

Amki, M.E. et al. (2020) 'Neutrophils Obstructing Brain Capillaries Are a Major Cause of No-Reflow in Ischemic Stroke', Cell Reports, 33(2). doi:10.1016/j.celrep.2020.108260.

Anrather, J. and Iadecola, C. (2016) 'Inflammation and Stroke: An Overview', Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 13(4), pp. 661–670. doi:10.1007/s13311-016-0483-x.

Benakis, C., Llovera, G. and Liesz, A. (2018) 'The meningeal and choroidal infiltration routes for leukocytes in stroke', Therapeutic Advances in Neurological Disorders, 11, p. 1756286418783708. doi:10.1177/1756286418783708.

Bindea, G. et al. (2009) 'ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks', Bioinformatics (Oxford, England), 25(8), pp. 1091–1093. doi:10.1093/bioinformatics/btp101.

Candelario-Jalil, E. and Paul, S. (2021) 'Impact of aging and comorbidities on ischemic stroke outcomes in preclinical animal models: A translational perspective', Experimental Neurology, 335, p. 113494. doi:10.1016/j.expneurol.2020.113494.

Dorrier, C.E. et al. (2021) 'Emerging roles for CNS fibroblasts in health, injury and disease', Nature Reviews Neuroscience, pp. 1–12. doi:10.1038/s41583-021-00525-w.

Drieu, A. et al. (2018) 'Anti-inflammatory treatments for stroke: from bench to bedside', Therapeutic Advances in Neurological Disorders, 11, p. 1756286418789854. doi:10.1177/1756286418789854.

Drieu, A. et al. (2020) 'Alcohol exposure-induced neurovascular inflammatory priming impacts ischemic stroke and is linked with brain perivascular macrophages', JCI insight [Preprint]. doi:10.1172/jci.insight.129226.

Fabriek, B.O. et al. (2005) 'CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation', Glia, 51(4), pp. 297–305. doi:10.1002/glia.20208.

Faraco, G. et al. (2016) 'Perivascular macrophages mediate the neurovascular and cognitive dysfunction associated with hypertension', Journal of Clinical Investigation, 126(12), pp. 4674–4689. doi:10.1172/JCI86950.

Fernández-Klett, F. et al. (2013) 'Early loss of pericytes and perivascular stromal cell-induced scar formation after stroke', Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 33(3), p. 428. doi:10.1038/jcbfm.2012.187.

Gauberti, M. et al. (2014) 'Lack of Secondary Microthrombosis After Thrombin-Induced Stroke in Mice and Non-Human Primates', Journal of thrombosis and haemostasis: JTH, 12(3), pp. 409–414. doi:10.1111/jth.12487.

Haley, M.J. et al. (2019) 'Microglial Priming as Trained Immunity in the Brain', Neuroscience, 405, pp. 47–54. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.12.039.

Katan, M. and Luft, A. (2018) 'Global Burden of Stroke', Seminars in Neurology, 38(2), pp. 208–211. doi:10.1055/s-0038-1649503.

Kida, S. et al. (1993) 'Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages', Acta Neuropathologica, 85(6), pp. 646–652.

Lehenkari, P.P. et al. (2002) 'Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite', Molecular Pharmacology, 61(5), pp. 1255–1262.

Levard, D. et al. (2020) 'Filling the gaps on stroke research: focus on inflammation and immunity', Brain, Behavior, and Immunity [Preprint]. doi:10.1016/j.bbi.2020.09.025.

Llovera, G. et al. (2014) 'Modeling Stroke in Mice: Permanent Coagulation of the Distal Middle Cerebral Artery', Journal of Visualized Experiments : JoVE [Preprint], (89). doi:10.3791/51729.

Månberg, A. et al. (2021) 'Altered perivascular fibroblast activity precedes ALS disease onset', Nature Medicine, 27(4), pp. 640–646. doi:10.1038/s41591-021-01295-9.

Mendes-Jorge, L. et al. (2009) 'Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier', Investigative Ophthalmology & Visual Science, 50(12), pp. 5997–6005. doi:10.1167/iovs.09-3515.

Moriyama, Y. and Nomura, M. (2018) 'Clodronate: A Vesicular ATP Release Blocker', Trends in Pharmacological Sciences, 39(1), pp. 13–23. doi:10.1016/j.tips.2017.10.007.

Mozaffarian, D. et al. (2016) 'Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association', Circulation, 133(4), pp. e38-360. doi:10.1161/CIR.0000000000000350.

Mrdjen, D. et al. (2018) 'High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease', Immunity, 48(2), pp. 380-395.e6. doi:10.1016/j.immuni.2018.01.011.

Muriach, M. et al. (2014) 'Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy', Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014, p. 102158. doi:10.1155/2014/102158.

Niraula, A., Sheridan, J.F. and Godbout, J.P. (2017) 'Microglia Priming with Aging and Stress', Neuropsychopharmacology, 42(1), pp. 318–333. doi:10.1038/npp.2016.185.

Norden, D.M., Muccigrosso, M.M. and Godbout, J.P. (2015) 'Microglial priming and enhanced reactivity to secondary insult in aging, and traumatic CNS injury, and neurodegenerative disease', Neuropharmacology, 96, pp. 29–41. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.10.028.

Orset, C. et al. (2007) 'Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion', Stroke, 38(10), pp. 2771–2778. doi:10.1161/STROKEAHA.107.487520.

Park, L. et al. (2017) 'Brain Perivascular Macrophages Initiate the Neurovascular Dysfunction of Alzheimer Aβ Peptides', Circulation Research, 121(3), pp. 258–269. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311054.

Pedragosa, J. et al. (2018) 'CNS-border associated macrophages respond to acute ischemic stroke attracting granulocytes and promoting vascular leakage', Acta Neuropathologica Communications, 6(1), p. 76. doi:10.1186/s40478-018-0581-6.

Polfliet, M.M. et al. (2001) 'A method for the selective depletion of perivascular and meningeal macrophages in the central nervous system', Journal of Neuroimmunology, 116(2), pp. 188–195.

Popa-Wagner, A. et al. (2020) 'Ageing as a risk factor for cerebral ischemia: Underlying mechanisms and therapy in animal models and in the clinic', Mechanisms of Ageing and Development, 190, p. 111312. doi:10.1016/j.mad.2020.111312.

Quenault, A. et al. (2017) 'Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack', Brain, 140(1), pp. 146–157. doi:10.1093/brain/aww260.

Sacco, R.L. et al. (1997) 'American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Risk factors', Stroke, 28(7), pp. 1507–1517. doi:10.1161/01.str.28.7.1507.

Sadler, R. et al. (2019) 'Short-chain fatty acids improve post-stroke recovery via immunological mechanisms', The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience [Preprint]. doi:10.1523/JNEUROSCI.1359-19.2019.

Utz, S.G. and Greter, M. (2019) 'Checking macrophages at the border', Nature Neuroscience, 22(6), pp. 848–850. doi:10.1038/s41593-019-0411-6.

Virani, S.S. et al. (2020) 'Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association', Circulation, 141(9), pp. e139–e596. doi:10.1161/CIR.0000000000000757.

Winklewski, P.J. et al. (2015) 'Brain inflammation and hypertension: the chicken or the egg?', Journal of Neuroinflammation, 12, p. 85. doi:10.1186/s12974-015-0306-8.

Yu, G. et al. (2012) 'clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters', OMICS : a Journal of Integrative Biology, 16(5), p. 284. doi:10.1089/omi.2011.0118.

Pharmacological inhibition of EZH2 suppresses pain in mice with monoiodoacetate-induced osteoarthritis by regulating inflammation, oxidative stress, and autophagy in synovial cells.

Brochard Sybille[1], Aury-Landas Juliette[1], Agin Véronique[3], Bernay Benoit[2], Pontin Julien[2], **Seillier Célia[3]**, Toutirais Olivier[3], Cohen-Solal Martine[4], Hay Eric[4], Boumediene Karim[1], Baugé Catherine[1].

1.EA7451 BioConnecT, Normandie Univ, Université de Caen, CAEN, France, 2. Proteogen platform, Normandie Univ, UNICAEN, Caen, France, 3. UMRS1237 PhIND, INSERM, Normandie Univ, Inst. Blood and Brain @ Caen-Normandie, Université de Caen, CAEN, France, 4. UMR1132 BIOSCAR, INSERM, Université de Paris, PARIS, France.

Purpose: Recently, we and others have shown that Enhancer of Zest Homolog 2 (EZH2), the major histone methyltransferase that catalyzes trimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27me3), plays a major role in osteoarthritis (OA) progression by regulating chondrocytes hypertrophy and catabolism. However, whether EZH2 play a role in pain, which is the most common and disabling symptom of osteoarthritis is not yet known. Herein, we tested whether EZH2 inhibition could reduce pain in addition to OA progression in monoiodoacetate (MIA)-induced mice model of knee joint OA pain, and investigated the role of EZH2 in human OA synovial cells.

Methods: C57bl/6j mice received a single intra-articular injection of MIA into the right (ipsilateral) knee joint followed by three injections of EZH2 inhibitor (EPZ-6438) or vehicle (DMSO). Pain behavior was assessed before induction of OA and then weekly until study completion on day 56, by measuring static weight-bearing (SWB) and punctate tactile paw withdrawal threshold (PWT). Cartilage damage was evaluated by histological analysis and a scoring system. Next, the role of EZH2 were investigated in human OA synovial cells which were stimulated by Interleukin 1β (IL-1β) or lipopolysaccharide (LPS) in the presence or not of the EZH2 inhibitor. The expression of markers of catabolism, inflammation and pain was studied by RT-PCR, and pathways deregulated by treatment were investigated by proteomics and bioinformatics analysis.

Results: Intra-articular injections of the EZH2 inhibitor suppressed pain and improved disease progression in OA mice. In addition, we showed that EZH2 is upregulated by IL-1β and LPS in human synovial cells and that its inhibition downregulated the expression of markers of catabolism (MMPs), inflammation (IL-1β, IL-6) and pain (NGF) in these cells. Proteomics analysis revealed that the proteins whose expression was deregulated by EZH2 inhibition, were mainly involved in autophagy, oxidation-reduction process/glutathione metabolism, glycolysis/carbohydrate metabolic process, and immune system.

Conclusions: This study confirms that the pharmacological inhibition of the histone methyl-transferase EZH2 slows the progression of osteoarthritis and demonstrated that in addition to reduce cartilage degradation, it attenuates pain in experimental OA model. In addition, our data provide new insights into how EZH2 affects synovial cells to alleviate OA.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, R. A. *et al.* (2007) 'The fibrin-derived γ377-395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease', *Journal of Experimental Medicine*, 204(3), pp. 571–582. doi: 10.1084/jem.20061931.

Aguilar, S. *et al.* (2004) 'Tissue Plasminogen Activator in Murine Exocrine Pancreas Cancer', *The American Journal of Pathology*. Am J Pathol, 165(4), pp. 1129–1139. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63374-3.

Al-Horani, R. (2015) 'Serpin Regulation of Fibrinolytic System: Implications for Therapeutic Applications in Cardiovascular Diseases', *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 12(2), pp. 91–125. doi: 10.2174/1871525712666141106095927.

Aliberti, J. *et al.* (2003) 'Essential role for ICSBP in the *in vivo* development of murine CD8α+dendritic cells', *Blood*. Content Repository Only!, 101(1), pp. 305–310. doi: 10.1182/BLOOD-2002-04-1088.

Ammon, C. *et al.* (2000) 'Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells', *Immunology*. Immunology, 100(3), pp. 364–369. doi: 10.1046/J.1365-2567.2000.00056.X.

Anfray, A. *et al.* (2020) 'Circulating tPA contributes to neurovascular coupling by a mechanism involving the endothelial NMDA receptors', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 40(10), pp. 2038–2054. doi: 10.1177/0271678X19883599.

dos Anjos Cassado, A. (2017) 'F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen', in *Results and Problems in Cell Differentiation*, pp. 161–179. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_7.

Arase, N. *et al.* (2005) 'Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells', *International Immunology*, 17(9), pp. 1227–1237. doi: 10.1093/intimm/dxh299.

Armstead, W. M., Cines, D. B. and Higazi, A. A. R. (2004) 'Altered NO function contributes to impairment of uPA and tPA cerebrovasodilation after brain injury', *Journal of neurotrauma*. J Neurotrauma, 21(9), pp. 1204–1211. doi: 10.1089/NEU.2004.21.1204.

Astrup, T. and Permin, P. M. (1947) 'Fibrinolysis in the Animal Organism', *Nature*. Nature, 159(4046), pp. 681–682. doi: 10.1038/159681b0.

Astrup, T. and Stage, A. (1952) 'Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue', *Nature*. Nature, 170(4335), p. 929. doi: 10.1038/170929A0.

Austyn, J. M. and Gordon, S. (1981) 'F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage', *European Journal of Immunology*. Eur J Immunol, 11(10), pp. 805–815. doi: 10.1002/eji.1830111013.

Azuma, M. *et al.* (1993) 'B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28', *Nature*. Nature, 366(6450), pp. 76–79. doi: 10.1038/366076a0.

Balan, S. *et al.* (2018) 'Large-Scale Human Dendritic Cell Differentiation Revealing Notch-Dependent Lineage Bifurcation and Heterogeneity', *Cell reports*. Cell Rep, 24(7), pp. 1902-1915.e6. doi: 10.1016/J.CELREP.2018.07.033.

Balan, S., Saxena, M. and Bhardwaj, N. (2019) 'Dendritic cell subsets and locations', in *International Review of Cell and Molecular Biology*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 1–68. doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.07.004.

Barclay, A. N. and Van Den Berg, T. K. (2014) 'The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPα) and CD47: structure, function, and therapeutic target', *Annual review of immunology*. Annu Rev Immunol, 32, pp. 25–50. doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032713-120142.

Bellón, T. *et al.* (2011) 'Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. Nephrol Dial Transplant, 26(9), pp. 2995–3005. doi: 10.1093/NDT/GFQ771.

Benchenane, K. *et al.* (2005) 'Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis', *Circulation*. Circulation, 111(17), pp. 2241–2249. doi: 10.1161/01.CIR.0000163542.48611.A2.

Beutler, B. (2000) 'Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Current Trends, 12(1), pp. 20–26. doi: 10.1016/S0952-7915(99)00046-1.

Bevan, M. J. (2006) 'Cross-priming', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 7(4), pp. 363–365. doi: 10.1038/ni0406-363.

Bigley, V. and Collin, M. (2020) 'Insights from Patients with Dendritic Cell Immunodeficiency', *Molecular Immunology*. Mol Immunol, 122, pp. 116–123. doi: 10.1016/j.molimm.2020.04.019.

Binder, B. R., Spragg, J. and Austen, K. F. (1979) 'Purification and characterization of human vascular plasminogen activator derived from blood vessel perfusates', *Journal of Biological Chemistry*. © 1979 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 254(6), pp. 1998–2003. doi: 10.1016/s0021-9258(17)37756-6.

Biswas, S. K. *et al.* (2012) 'Macrophage polarization and plasticity in health and disease', *Immunologic Research*. Immunol Res, 53(1–3), pp. 11–24. doi: 10.1007/s12026-012-8291-9.

Bonaventura, A. *et al.* (2021) 'Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19', *Nature Reviews Immunology*. Springer US, 21(5), pp. 319–329. doi: 10.1038/s41577-021-00536-9.

Bonnardel, J. *et al.* (2019) 'Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche', *Immunity*. Immunity, 51(4), pp. 638-654.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2019.08.017.

Borges Da Silva, H. *et al.* (2015) 'Splenic macrophage subsets and their function during blood-borne infections', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 6(SEP), p. 480. doi: 10.3389/FIMMU.2015.00480/BIBTEX.

Boulaftali, Y. *et al.* (2010) 'Anticoagulant and antithrombotic properties of platelet protease nexin-1', *Blood*, 115(1), pp. 97–106. doi: 10.1182/blood-2009-04-217240.

Boulaftali, Y. *et al.* (2011) 'Platelet Protease Nexin-1, a Serpin That Strongly Influences Fibrinolysis and Thrombolysis', *Circulation*. Circulation, 123(12), pp. 1326–1334. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000885.

Bouma, B. N. and Meijers, J. C. M. (2003) 'Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U)', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. J Thromb Haemost, 1(7), pp. 1566–1574. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00329.x.

Breton, G. *et al.* (2015) 'Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells', *Journal of Experimental Medicine*, 212(3), pp. 401–413. doi: 10.1084/jem.20141441.

Broos, K. *et al.* (2011) 'Platelets at work in primary hemostasis', *Blood Reviews*. Blood Rev, 25(4), pp. 155–167. doi: 10.1016/j.blre.2011.03.002.

Broze, G. J. (2003) 'The rediscovery and isolation of TFPI', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. John Wiley & Sons, Ltd, 1(8), pp. 1671–1675. doi: 10.1046/J.1538-7836.2003.00391.X.

Brunet, J. F. *et al.* (1987) 'A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4', *Nature*. Nature, 328(6127), pp. 267–270. doi: 10.1038/328267A0.

Bu, G. *et al.* (1992) 'Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(16), pp. 7427–7431. doi: 10.1073/PNAS.89.16.7427.

Buisson, A. *et al.* (1998) 'Up-regulation of a serine protease inhibitor in astrocytes mediates the neuroprotective activity of transforming growth factor beta1', *FASEB J*.

Burysek, L., Syrovets, T. and Simmet, T. (2002) 'The Serine Protease Plasmin Triggers Expression of MCP-1 and CD40 in Human Primary Monocytes via Activation of p38 MAPK and Janus Kinase (JAK)/STAT Signaling Pathways', *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, 277(36), pp. 33509–33517. doi: 10.1074/jbc.M201941200.

Burzynski, L. C. *et al.* (2019) 'The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1α by Thrombin', *Immunity*. The Author(s), 50(4), pp. 1033-1042.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.003.

Buxadé, M. *et al.* (2018) 'Macrophage-specific MHCII expression is regulated by a remote Ciita enhancer controlled by NFAT5', *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 215(11), pp. 2901–2918. doi: 10.1084/jem.20180314.

Cancel, J. C. *et al.* (2019) 'Are conventional type 1 dendritic cells critical for protective antitomor immunity and how?', *Frontiers in Immunology*, 10(FEB). doi: 10.3389/fimmu.2019.00009.

Cao, C. *et al.* (2010) 'The efficacy of activated protein C in murine endotoxemia is dependent on integrin CD11b', *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest, 120(6), pp. 1971–1980. doi:

10.1172/JCI40380.

Carmeliet, P. *et al.* (1997) 'Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation', *Nature genetics*. Nat Genet, 17(4), pp. 439–444. doi: 10.1038/NG1297-439.

Caruso, A. *et al.* (1997) 'Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation', *Cytometry*, 27(1), pp. 71–76. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<71::AID-CYTO9>3.0.CO;2-O.

Cassado, A. A., D'Império Lima, M. R. and Bortoluci, K. R. (2015) 'Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 6(MAY), p. 225. doi: 10.3389/FIMMU.2015.00225/BIBTEX.

Cassado, A. dos A. *et al.* (2011) 'Cellular renewal and improvement of local cell effector activity in peritoneal cavity in response to infectious stimuli', *PloS one*. PLoS One, 6(7). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0022141.

Cesarman-Maus, G. and Hajjar, K. A. (2005) 'Molecular mechanisms of fibrinolysis', *British Journal of Haematology*. Br J Haematol, 129(3), pp. 307–321. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05444.x.

Chambers, M. *et al.* (2021) 'Macrophage Plasticity in Reproduction and Environmental Influences on Their Function', *Frontiers in Immunology*. Frontiers, 11, p. 3491. doi: 10.3389/fimmu.2020.607328.

Chandra, J. *et al.* (2017) 'Batf3 selectively determines acquisition of CD8 + dendritic cell phenotype and function', *Immunology and Cell Biology*. Nature Publishing Group, 95(2), pp. 215–223. doi: 10.1038/icb.2016.83.

Chao, M. P. *et al.* (2010) 'Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma', *Cell*. Cell, 142(5), pp. 699–713. doi: 10.1016/J.CELL.2010.07.044.

Chapin, J. C. and Hajjar, K. A. (2015) 'Fibrinolysis and the control of blood coagulation', *Blood Reviews*. Blood Rev, 29(1), pp. 17–24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.

Chawla, A., Nguyen, K. D. and Goh, Y. P. S. (2011) 'Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease', *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol, 11(11), pp. 738–749. doi:

10.1038/nri3071.

Chen, M. *et al.* (2007) 'Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets', *Molecular Immunology*, 44(10), pp. 2558–2565. doi: 10.1016/j.molimm.2006.12.020.

Chen, Y. *et al.* (2013) 'A type I IFN – Flt3 ligand axis augments plasmacytoid dendritic cell development from common lymphoid progenitors', 210(12), pp. 2515–2522. doi: 10.1084/jem.20130536.

Chu, R. S. *et al.* (1999) 'CpG oligodeoxynucleotides down-regulate macrophage class II MHC antigen processing.', *Journal of immunology*, 163(3), pp. 1188–94. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415013.

Cipolla, M. J., Lessov, N. and Clark, W. M. (2000) 'Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator', *Stroke*. Stroke, 31(4), pp. 940–945. doi: 10.1161/01.STR.31.4.940.

Claesson-Welsh, L. (2015) 'Vascular permeability—the essentials', *Upsala Journal of Medical Sciences*. Upsala Medical Society, 120(3), p. 135. doi: 10.3109/03009734.2015.1064501.

Cleator, J. H. and Vaughan, D. E. (2008) 'Clinical Implications of the Contrasting Effects of *In vivo* Thrombin Receptor Activation (Protease-Activated Receptor Type 1) on the Human Vasculature∗', *Journal of the American College of Cardiology*. American College of Cardiology FoundationWashington, D.C., 51(18), pp. 1757–1759. doi: 10.1016/J.JACC.2008.01.037.

Cline, M. J. and Moore, M. A. S. (1972) 'Embryonic Origin of the Mouse Macrophage', *Blood*. American Society of Hematology, 39(6), pp. 842–849. doi: 10.1182/blood.V39.6.842.842.

Collin, M. and Bigley, V. (2018) 'Human dendritic cell subsets: an update', *Immunology*. Immunology, 154(1), pp. 3–20. doi: 10.1111/IMM.12888.

Copin, R. *et al.* (2007) 'MyD88-Dependent Activation of B220 – CD11b + LY-6C + Dendritic Cells during Brucella melitensis Infection', *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 178(8), pp. 5182–5191. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5182.

Correa, F. *et al.* (2011) 'Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke', *The Journal of experimental medicine*. J Exp Med, 208(6), pp. 1229–1242. doi: 10.1084/JEM.20101880.

Crozat, K., Guiton, R., Guilliams, M., *et al.* (2010) 'Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets', *Immunological Reviews*, 234(1), pp. 177–198. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00868.x.

Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., *et al.* (2010) 'The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8α+ dendritic cells', *Journal of Experimental Medicine*, 207(6), pp. 1283–1292. doi: 10.1084/jem.20100223.

Cugno, M. *et al.* (2004) 'Antibodies to tissue-type plasminogen activator (tPA) in patients with antiphospholipid syndrome: evidence of interaction between the antibodies and the catalytic domain of tPA in 2 patients', *Blood*. Blood, 103(6), pp. 2121–2126. doi: 10.1182/BLOOD-2003-07-2422.

Cumano, A. *et al.* (1992) 'Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver', *Nature*. Nature Publishing Group, 356(6370), pp. 612–615. doi: 10.1038/356612a0.

Dahl, L. C. M. *et al.* (2016) 'The Influence of Differentially Expressed Tissue-Type Plasminogen Activator in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Implications for Multiple Sclerosis', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(7). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0158653.

Dahlbäck, B. (2000) 'Blood coagulation', *The Lancet*. Lancet, 355(9215), pp. 1627–1632. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02225-X.

Dai, X. *et al.* (2020) 'USP7 targeting modulates anti-tumor immune response by reprogramming Tumor-associated Macrophages in Lung Cancer', *Theranostics*. Theranostics, 10(20), pp. 9332–9347. doi: 10.7150/thno.47137.

Dantschakoff, W. (1908) 'Untersuchungen über die Entwickelung des Blutes und Bindegewebes bei den Vögeln', *Beiträge und Referate zur Anatomie und Entwickelungsgeschichte*. Springer, 37(3), pp. 471–587. doi: 10.1007/BF02284778.

Das, A. *et al.* (2015) 'Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration', *The American Journal of Pathology*. Elsevier, 185(10), pp. 2596–2606. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.001.

Das, R., Pluskota, E. and Plow, E. F. (2010) 'Plasminogen and Its Receptors as Regulators of Cardiovascular Inflammatory Responses', *Trends in cardiovascular medicine*. NIH Public Access, 20(4), p. 120. doi: 10.1016/J.TCM.2010.10.002.

Dassah, M. A. *et al.* (2009) 'The Endothelial Cell Annexin A2 System and Vascular Fibrinolysis', *General physiology and biophysics*. NIH Public Access, 28(SPEC), p. F20. Available at: /pmc/articles/PMC3014645/ (Accessed: 25 January 2022).

Davie, E. W. and Ratnoff, O. D. (1964) 'Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting', *Science*. Science, 145(3638), pp. 1310–1312. doi: 10.1126/science.145.3638.1310.

Davies, L. C. *et al.* (2011) 'A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation', *European Journal of Immunology*. Eur J Immunol, 41(8), pp. 2155–2164. doi: 10.1002/eji.201141817.

Davies, L. C. *et al.* (2013) 'Tissue-resident macrophages', *Nature Immunology*. Nat Immunol, 14(10), pp. 986–995. doi: 10.1038/ni.2705.

Delvaeye, M. and Conway, E. M. (2009) 'Coagulation and innate immune responses: Can we view them separately?', *Blood*, 114(12), pp. 2367–2374. doi: 10.1182/blood-2009-05-199208.

DiPietro, L. A., Wilgus, T. A. and Koh, T. J. (2021) 'Macrophages in Healing Wounds: Paradoxes and Paradigms', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 22(2), p. 950. doi: 10.3390/ijms22020950.

Docagne, F. *et al.* (2015) 'Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke', *Stroke*, 46(1), pp. 314–320. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006698.

Doulatov, S. *et al.* (2010) 'Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 11(7), pp. 585–593. doi: 10.1038/ni.1889.

Draxler, D. F. *et al.* (2019) 'Tranexamic acid modulates the immune response and reduces postsurgical infection rates', *Blood advances*. Blood Adv, 3(10), pp. 1598–1609. doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2019000092.

Draxler, D. F., Sashindranath, M. and Medcalf, R. L. (2017) 'Plasmin: A Modulator of Immune Function', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 43(2), pp. 143–153. doi: 10.1055/s-0036-1586227.

Drobits, B. *et al.* (2012) 'Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by

converting pDCs into tumor-killing effector cells', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 122(2), pp. 575–585. doi: 10.1172/JCI61034.

Duluc, D. *et al.* (2007) 'Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells', *Blood*. Blood, 110(13), pp. 4319–4330. doi: 10.1182/blood-2007-02-072587.

Dupasquier, M. *et al.* (2006) 'The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD301/mMGL in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/IL-13 signaling', *Journal of Leukocyte Biology*. J Leukoc Biol, 80(4), pp. 838–849. doi: 10.1189/jlb.1005564.

Durai, V. and Murphy, K. M. (2016) 'Functions of Murine Dendritic Cells', *Immunity*. Elsevier Inc., 45(4), pp. 719–736. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.010.

Dziennis, S. *et al.* (1995) 'The CD11b promoter directs high-level expression of reporter genes in macrophages in transgenic mice [published erratum appears in Blood 1995 Apr 1;85(7):1983]', *Blood*. Content Repository Only!, 85(2), pp. 319–329. doi: 10.1182/blood.V85.2.319.319.

East, E. *et al.* (2005) 'A Role for the Plasminogen Activator System in Inflammation and Neurodegeneration in the Central Nervous System during Experimental Allergic Encephalomyelitis', *The American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 167(2), p. 545. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62996-3.

Edelson, B. T. *et al.* (2010) 'Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8α+ conventional dendritic cells', *Journal of Experimental Medicine*, 207(4), pp. 823–836. doi: 10.1084/jem.20091627.

Eisenbarth, S. C. (2019) 'Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function', *Nature Reviews Immunology*, 19(2), pp. 89–103. doi: 10.1038/s41577-018-0088-1.

Esmon, C. T., Xu, J. and Lupu, F. (2011) 'Innate immunity and coagulation', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. J Thromb Haemost, 9(Suppl 1), pp. 182–188. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04323.x.

Ezekowitz, R. *et al.* (1981) 'Surface properties of bacillus calmette-guerin-activated mouse macrophages: Reduced expression of mannose-specific endocytosis, fc receptors, and antigen

F4/80 accompanies induction of Ia', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 154(1), pp. 60–76. doi: 10.1084/jem.154.1.60.

Ezekowitz, R. and Gordon, S. (1982) 'Down-regulation of mannosyl receptor-mediated endocytosis and antigen F4/80 in bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Role of T lymphocytes and lymphokines', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 155(6), pp. 1623–1637. doi: 10.1084/jem.155.6.1623.

Falati, S. *et al.* (2002) 'Real-time *in vivo* imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse', *Nature medicine*. Nat Med, 8(10), pp. 1175–1180. doi: 10.1038/NM782.

Fallon, P. G., Allen, R. L. and Rich, T. (2001) 'Primitive Toll signalling: bugs, flies, worms and man', *Trends in Immunology*. Elsevier Current Trends, 22(2), pp. 63–66. doi: 10.1016/S1471-4906(00)01800-7.

Feng, Y. *et al.* (2019) 'Direct and Indirect Roles of Macrophages in Hypertrophic Scar Formation', *Frontiers in Physiology*. Frontiers, 10(AUG), p. 1101. doi: 10.3389/fphys.2019.01101.

Fernandes, L. G. *et al.* (2016) 'Leptospira spp.: Novel insights into host–pathogen interactions', *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier B.V., 176, pp. 50–57. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.12.004.

Fingleton, B. (2017) 'Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier, 1864(11), pp. 2036–2042. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.010.

Finotti, G. *et al.* (2016) 'Endogenously produced TNF-α contributes to the expression of CXCL10/IP-10 in IFN-λ3-activated plasmacytoid dendritic cells', *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 99(1), pp. 107–119. doi: 10.1189/jlb.3VMA0415-144R.

Flemmig, M. and Melzig, M. F. (2012) 'Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. J Pharm Pharmacol, 64(8), pp. 1025–1039. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01457.x.

Flood, E. C. and Hajjar, K. A. (2011) 'The annexin A2 system and vascular homeostasis', *Vascular Pharmacology*. NIH Public Access, 54(3–6), pp. 59–67. doi: 10.1016/j.vph.2011.03.003.

Fredriksson, L. *et al.* (2004) 'Tissue plasminogen activator is a potent activator of PDGF-CC', *The EMBO journal*. EMBO J, 23(19), pp. 3793–3802. doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600397.

Freedman, A S *et al.* (1987) 'B7 , a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells.', *Journal of immunology*.

Freeman, G. *et al.* (1993) 'Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation', *Science*, 262(5135), pp. 909–911. doi: 10.1126/science.7694363.

Freeman, G. J. *et al.* (1989) 'B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells.', *The Journal of Immunology*, 142.

Freeman, G. J. *et al.* (1993) 'Murine b7-2, an alternative ctla4 counter-receptor that costimulates t cell proliferation and interleukin 2 production', *Journal of Experimental Medicine*, 178(6), pp. 2185–2192. doi: 10.1084/jem.178.6.2185.

Frey, A. *et al.* (2020) 'More Than Just a Barrier: The Immune Functions of the Airway Epithelium in Asthma Pathogenesis', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 11. doi: 10.3389/FIMMU.2020.00761/PDF.

Fujimoto, Y. *et al.* (2002) 'CD83 Expression Influences CD4+ T Cell Development in the Thymus', *Cell*. Cell Press, 108(6), pp. 755–767. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00673-6.

van Furth, R. (1980) 'Methods for Studying Mononuclear Phagocytes', in Adams, D. O., Edelson, P. J. & Koren, H. (ed.) *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*. Academic Press, pp. 243–252.

Van Furth, R. *et al.* (1972) 'The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells', *Memoranda*.

van Furth, R. and Cohn, Z. (1968) 'The origin and kinetics of mononuclear phagocytes', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 128(3), pp. 415–435. doi: 10.1084/jem.128.3.415.

Galvin, F *et al.* (1992) 'Murine B7 antigen provides a sufficient costimulatory signal for antigen-specific and MHC-restricted T cell activation.', *Journal of immunology*.

García-Martínez, L. F. *et al.* (2004) 'A Novel Mutation in CD83 Results in the Development of a Unique Population of CD4 + T Cells', *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 173(5), pp. 2995–3001. doi: 10.4049/jimmunol.173.5.2995.

Gebbink, M. F. B. G. (2011) 'Tissue-type plasminogen activator-mediated plasminogen activation and contact activation, implications in and beyond haemostasis', *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. J Thromb Haemost, 9 Suppl 1(1 S), pp. 174–181. doi: 10.1111/J.1538-7836.2011.04278.X.

Geissmann, F. *et al.* (2010) 'Development of monocytes, macrophages and dendritic cells', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 327(5966), p. 656. doi: 10.1126/SCIENCE.1178331.

Gene, M. (2014) *Innate or non-specific immunity, Microbiology and immunology; University of South Carolina School of medicine*. Available at: http://web.archive.org/web/20160326050416/http://www.microbiologybook.org/ghaffar/innate.htm (Accessed: 15 January 2022).

Germolec, D. R. *et al.* (2018) 'Markers of Inflammation', in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. Methods Mol Biol, pp. 57–79. doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4_5.

Ghosn, E. E. B. *et al.* (2010) 'Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(6), pp. 2568–2573. doi: 10.1073/pnas.0915000107.

Gimmi, C. D. *et al.* (1991) 'B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(15), pp. 6575–6579. doi: 10.1073/pnas.88.15.6575.

Ginhoux, F. *et al.* (2009) 'The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs', *Journal of Experimental Medicine*, 206(13), pp. 3115–3130. doi: 10.1084/jem.20091756.

Ginhoux, F. and Jung, S. (2014) 'Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 14(6), pp. 392–404. doi: 10.1038/nri3671.

Girod, S. *et al.* (1992) 'Role of the physiochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium.', *The European respiratory journal*, 5(4), pp. 477–87. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1563506.

Göbel, K. *et al.* (2016) 'Blood coagulation factor XII drives adaptive immunity during neuroinflammation via CD87-mediated modulation of dendritic cells', *Nature communications*.

Nat Commun, 7. doi: 10.1038/NCOMMS11626.

Godier, A. and Hunt, B. J. (2013) 'Plasminogen receptors and their role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune and malignant disease', *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. J Thromb Haemost, 11(1), pp. 26–34. doi: 10.1111/JTH.12064.

Gong, M., Zhuo, X. and Ma, A. (2017) 'STAT6 Upregulation Promotes M2 Macrophage Polarization to Suppress Atherosclerosis', *Medical Science Monitor Basic Research*. Med Sci Monit Basic Res, 23, pp. 240–249. doi: 10.12659/MSMBR.904014.

Gordon, S. *et al.* (1992) 'Antigen markers of macrophage differentiation in murine tissues', *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Curr Top Microbiol Immunol, pp. 1–37. doi: 10.1007/978-3-642-77377-8_1.

Gordon, S. *et al.* (2011) 'F4/80 and the related adhesion-GPCRs', *European Journal of Immunology*, 41(9), pp. 2472–2476. doi: 10.1002/eji.201141715.

Grajales-Reyes, G. E. *et al.* (2015) 'Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8α+ conventional DC clonogenic progenitor', *Nature Immunology 2015 16:7*. Nature Publishing Group, 16(7), pp. 708–717. doi: 10.1038/ni.3197.

Granot, T. *et al.* (2017) 'Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life', *Immunity*. Cell Press, 46(3), pp. 504–515. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.019.

Griffiths, K. L., Tan, J. K. and O'Neill, H. C. (2014) 'Characterization of the effect of <scp>LPS</scp> on dendritic cell subset discrimination in spleen', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. J Cell Mol Med, 18(9), pp. 1908–1912. doi: 10.1111/jcmm.12332.

Grouard, G. *et al.* (1997) 'The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand', *Journal of Experimental Medicine*, 185(6), pp. 1101–1111. doi: 10.1084/jem.185.6.1101.

Guilliams, M. *et al.* (2014) 'Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny', *Nature Reviews Immunology 2014 14:8*. Nature Publishing Group, 14(8), pp. 571–578. doi: 10.1038/nri3712.

Guilliams, M. *et al.* (2016) 'Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species', *Immunity*. Immunity, 45(3), pp. 669–684. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2016.08.015.

Guo, Y. *et al.* (2011) 'Beneficial and Detrimental Effects of Plasmin(ogen) during Infection and Sepsis in Mice', *PLoS ONE*. Edited by D. Chakravortty. PLoS One, 6(9), p. e24774. doi: 10.1371/journal.pone.0024774.

Den Haan, J. M. M. and Kraal, G. (2012) 'Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen', *Journal of innate immunity*. J Innate Immun, 4(5–6), pp. 437–445. doi: 10.1159/000335216.

Haase, J. *et al.* (2014) 'Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation', *Diabetologia*. Diabetologia, 57(3), pp. 562–571. doi: 10.1007/s00125-013-3139-y.

Hajjar, K. A., Jacovina, A. T. and Chacko, J. (1994) 'An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II', *The Journal of biological chemistry*. J Biol Chem, 269(33), pp. 21191–21197. doi: 10.1016/s0021-9258(17)31947-6.

Hajjar, K. A. and Reynolds, C. M. (1994) 'alpha-Fucose-mediated binding and degradation of tissue-type plasminogen activator by HepG2 cells', *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest, 93(2), pp. 703–710. doi: 10.1172/JCI117023.

Hamann, J. *et al.* (1996) 'The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF).', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 184(3), pp. 1185–1189. doi: 10.1084/jem.184.3.1185.

Hansen, L. *et al.* (2015) 'E2-2 Dependent Plasmacytoid Dendritic Cells Control Autoimmune Diabetes', *PLOS ONE*. Edited by A. A. Freitas. Public Library of Science, 10(12), p. e0144090. doi: 10.1371/journal.pone.0144090.

Harding, C. V. and Boom, W. H. (2010) 'Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors', *Nature Reviews Microbiology*. Nat Rev Microbiol, 8(4), pp. 296–307. doi: 10.1038/nrmicro2321.

Hart, P. H. *et al.* (1996) 'Control of major histocompatibility complex class II expression on human monocytes by interleukin-4: regulatory effect of lipopolysaccharide', *Immunology*, 89(4), pp. 599–605. doi: 10.1046/j.1365-2567.1996.d01-779.x.

Hashimoto, D., Miller, J. and Merad, M. (2011) 'Dendritic Cell and Macrophage Heterogeneity *In vivo*', *Immunity*. Immunity, 35(3), pp. 323–335. doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.007.

Hastings, S., Myles, P. S. and Medcalf, R. L. (2021) 'Plasmin, Immunity, and Surgical Site Infection', *Journal of Clinical Medicine*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 10(10), p. 2070. doi: 10.3390/jcm10102070.

He, K.-L. *et al.* (2011) 'Feedback Regulation of Endothelial Cell Surface Plasmin Generation by PKC-dependent Phosphorylation of Annexin A2', *Journal of Biological Chemistry*. J Biol Chem, 286(17), pp. 15428–15439. doi: 10.1074/jbc.M110.185058.

Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2001) 'Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance', *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol, 1(2), pp. 126–134. doi: 10.1038/35100512.

Hébert, M. *et al.* (2016) 'The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA)', *Revue Neurologique*, 172(3), pp. 186–197. doi: 10.1016/j.neurol.2015.10.002.

Hedin, S. G. (1903) 'On the presence of a proteolytic enzyme in the normal serum of the ox', *The Journal of Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 30(2), pp. 195–201. doi: 10.1113/JPHYSIOL.1903.SP000989.

Hélie, P. *et al.* (2021) 'Tissue plasminogen activator worsens experimental autoimmune encephalomyelitis by complementary actions on lymphoid and myeloid cell responses', *Journal of Neuroinflammation*. J Neuroinflammation, 18(1), p. 52. doi: 10.1186/s12974-021-02102-5.

Herman, A. and Herman, A. P. (2019) 'Antimicrobial peptides activity in the skin', *Skin Research and Technology*. Skin Res Technol, 25(2), pp. 111–117. doi: 10.1111/srt.12626.

Hespel, C. and Moser, M. (2012) 'Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity', *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 42(10), pp. 2535–2543. doi: 10.1002/EJI.201242480.

Hildner, K. *et al.* (2008) 'Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8α+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity', *Science*, 322(5904), pp. 1097–1100. doi: 10.1126/science.1164206.

Hirsch, J. G. (1959) 'Immunity to infectious diseases: Review of some concepts of Metchnikoff', *Bacteriological Reviews*. Bacteriol Rev, 23(2), pp. 48–60. doi: 10.1128/br.23.2.48-60.1959.

Hiu, T. *et al.* (2008) 'Tissue plasminogen activator enhances the hypoxia/reoxygenation-induced impairment of the blood-brain barrier in a primary culture of rat brain endothelial cells', *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer, 28(8), pp. 1139–1146. doi: 10.1007/S10571-008-9294-

X/FIGURES/6.

Hoeffel, G. *et al.* (2015) 'C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages', *Immunity*. Immunity, 42(4), pp. 665–678. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.011.

Hoffmann, J. and Akira, S. (2013) 'Innate immunity', in *Current Opinion in Immunology*, pp. 1–3. doi: 10.1016/j.coi.2013.01.008.

Hohl, T. M. *et al.* (2009) 'Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection', *Cell host & microbe*. Cell Host Microbe, 6(5), pp. 470–481. doi: 10.1016/J.CHOM.2009.10.007.

Horwitz, D. A. *et al.* (2019) 'Rebalancing Immune Homeostasis to Treat Autoimmune Diseases', *Trends in Immunology*. Elsevier Inc., 40(10), pp. 888–908. doi: 10.1016/j.it.2019.08.003.

Hoylaerts, M. *et al.* (1981) 'Kinetics of the Activation of Plasminogen by Human Tissue Plasminogen Activator', *Journal of Biological Chemistry*. © 1982 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 257(6), pp. 2912–2919. doi: 10.1016/S0021-9258(19)81051-7.

Hozain, S. and Cottrell, J. (2020) 'CDllb+ targeted depletion of macrophages negatively affects bone fracture healing', *Bone*. Bone, 138, p. 115479. doi: 10.1016/j.bone.2020.115479.

Hu, K., Mars, W. M. and Liu, Y. (2008) 'Novel actions of tissue-type plasminogen activator in chronic kidney disease', *Frontiers in Bioscience*, pp. 5174–5186.

Huber, D. *et al.* (2002) 'Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both *in vitro* and *in vivo*', *Blood*. Blood, 99(10), pp. 3637–3645. doi: 10.1182/BLOOD.V99.10.3637.

Hume, D. A. *et al.* (1983) 'The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs.', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 158(5), pp. 1522–1536. doi: 10.1084/jem.158.5.1522.

Hume, D. A. and Gordon, S. (1983) 'Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in

renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 157(5), pp. 1704–1709. doi: 10.1084/jem.157.5.1704.

Hume, D. A., Perry, V. H. and Gordon, S. (1984) 'The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: Macrophages associated with epithelia', *The Anatomical Record*, 210(3), pp. 503–512. doi: 10.1002/ar.1092100311.

Hurtado, M. *et al.* (2007) 'Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells', *Gut*. Gut, 56(9), pp. 1266–1274. doi: 10.1136/GUT.2006.097188.

Iadecola, C. (2017) 'The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease', *Neuron*. Neuron, 96(1), pp. 17–42. doi: 10.1016/J.NEURON.2017.07.030.

Ichinose, A., Kisiel, W. and Fujikawa, K. (1984) 'Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes', *FEBS letters*. FEBS Lett, 175(2), pp. 412–418. doi: 10.1016/0014-5793(84)80779-6.

Idoyaga, J. *et al.* (2013) 'Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction', *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest, 123(2), pp. 844–854. doi: 10.1172/JCI65260.

Ingalls, R. R. and Golenbock, D. T. (1995) 'CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide', *Journal of Experimental Medicine*, 181(4), pp. 1473–1479. doi: 10.1084/jem.181.4.1473.

Ito, T. *et al.* (2000) 'Elevation of mRNA levels of tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator in hippocampus and cerebral cortex following middle cerebral artery occlusion in rats', *Neurological research*. Neurol Res, 22(4), pp. 413–419. doi: 10.1080/01616412.2000.11740693.

Iwanaga, S. (2002) 'The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab', *Current Opinion in Immunology*. Curr Opin Immunol, 14(1), pp. 87–95. doi: 10.1016/S0952-7915(01)00302-8.

Iwanaga, S. and Lee, B.-L. (2005) 'Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate

Animals', *BMB Reports*, 38(2), pp. 128–150. doi: 10.5483/BMBRep.2005.38.2.128.

Jablonski, K. A. *et al.* (2015) 'Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages', *PLOS ONE*. Edited by M. A. Olszewski, 10(12), p. e0145342. doi: 10.1371/journal.pone.0145342.

Jain, A. and Pasare, C. (2017) 'Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm', *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 198(10), pp. 3791–3800. doi: 10.4049/jimmunol.1602000.

Jaiswal, S. *et al.* (2009) 'CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis', *Cell*. Cell, 138(2), pp. 271–285. doi: 10.1016/J.CELL.2009.05.046.

Janela, B. *et al.* (2019) 'A Subset of Type I Conventional Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGFα-Mediated Recruitment of Neutrophils', *Immunity*. Immunity, 50(4), pp. 1069-1083.e8. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2019.03.001.

Jeannin, P., Jaillon, S. and Delneste, Y. (2010) 'Biologie des récepteurs de l'immunité innée : applications cliniques et thérapeutiques', *Revue Francophone des Laboratoires*. Elsevier, 2010(424), pp. 41–51. doi: 10.1016/S1773-035X(10)70608-0.

Jin, O. *et al.* (2010) 'Abnormalities in circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus', *Arthritis Research and Therapy*. BioMed Central, 12(4), pp. 1–11. doi: 10.1186/AR3075/FIGURES/5.

Kagitani, H. *et al.* (1985) 'Expression in E. coli of finger-domain lacking tissue-type plasminogen activator with high fibrin affinity', *FEBS*. FEBS Lett, 189(1), pp. 145–149. doi: 10.1016/0014-5793(85)80860-7.

Kalb, M. L. *et al.* (2012) 'TRAIL + Human Plasmacytoid Dendritic Cells Kill Tumor Cells *In vitro*: Mechanisms of Imiquimod- and IFN-α–Mediated Antitumor Reactivity', *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 188(4), pp. 1583–1591. doi: 10.4049/jimmunol.1102437.

Kambara, K. *et al.* (2015) '*In vivo* Depletion of CD206+ M2 Macrophages Exaggerates Lung Injury in Endotoxemic Mice', *The American Journal of Pathology*. Elsevier, 185(1), pp. 162–171. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.09.005.

Kaneko, M. *et al.* (1992) 'Interactions between the finger and kringle-2 domains of tissue-type

plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1', *Journal of biochemistry*. J Biochem, 111(2), pp. 244–248. doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.JBCHEM.A123744.

Kaur, B. P. and Secord, E. (2019) 'Innate Immunity', *Pediatric Clinics of North America*. Elsevier Inc, 66(5), pp. 905–911. doi: 10.1016/j.pcl.2019.06.011.

Kawai, T. and Akira, S. (2011) 'Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity', *Immunity*. Cell Press, 34(5), pp. 637–650. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.

Kawasaki, T. and Kawai, T. (2014) 'Toll-like receptor signaling pathways', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 5(SEP). doi: 10.3389/FIMMU.2014.00461/PDF.

Kim, P. Y. *et al.* (2012) 'A High Affinity Interaction of Plasminogen with Fibrin Is Not Essential for Efficient Activation by Tissue-type Plasminogen Activator', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 287(7), pp. 4652–4661. doi: 10.1074/jbc.M111.317719.

Kirchhofer, D. and Nemerson, Y. (1996) 'Initiation of blood coagulation: the tissue factor/factor VIIa complex', *Current opinion in biotechnology*. Curr Opin Biotechnol, 7(4), pp. 386–391. doi: 10.1016/S0958-1669(96)80112-1.

Kirkling, M. E. *et al.* (2018) 'Notch Signaling Facilitates *In vitro* Generation of Cross-Presenting Classical Dendritic Cells', *Cell reports*. Cell Rep, 23(12), pp. 3658-3672.e6. doi: 10.1016/J.CELREP.2018.05.068.

Knipe, L. *et al.* (2010) 'A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells', *Blood*. American Society of Hematology, 116(12), pp. 2183–2191. doi: 10.1182/blood-2010-03-276170.

Kobayashi, K. S. and van den Elsen, P. J. (2012) 'NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 12(12), pp. 813–820. doi: 10.1038/nri3339.

Koerner, T. J., Hamilton, T. A. and Adams, D. O. (1987) 'Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA.', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 139(1), pp. 239–43. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3108399.

Kourtzelis, I., Hajishengallis, G. and Chavakis, T. (2020) 'Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation', *Frontiers in Immunology*. Front Immunol, 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.00553.

Kratofil, R. M., Kubes, P. and Deniset, J. F. (2017) 'Monocyte Conversion During Inflammation and Injury', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 37(1), pp. 35–42. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308198.

Krem, M. M. and Cera, E. Di (2002) 'Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation', *Trends in Biochemical Sciences*. Trends Biochem Sci, 27(2), pp. 67–74. doi: 10.1016/S0968-0004(01)02007-2.

Kretzer, N. M. *et al.* (2016) 'RAB43 facilitates cross-presentation of cell-associated antigens by CD8α+ dendritic cells', *The Journal of experimental medicine*. J Exp Med, 213(13), pp. 2871–2883. doi: 10.1084/JEM.20160597.

Krystosek, A. and Seeds, N. W. (1981) 'Plasminogen activator secretion by granule neurons in cultures of developing cerebellum', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 78(12), pp. 7810–7814. doi: 10.1073/PNAS.78.12.7810.

Krzyszczyk, P. *et al.* (2018) 'The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes', *Frontiers in Physiology*. Frontiers, 9(MAY), p. 419. doi: 10.3389/fphys.2018.00419.

Kuiper, J. *et al.* (1988) 'Characterization of the interaction *in vivo* of tissue-type plasminogen activator with liver cells', *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), pp. 18220–18224. doi: 10.1016/s0021-9258(19)81348-0.

Kumar, V. *et al.* (2010) 'Tissue Renewal, Regeneration, and Repair', in *eds.*, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th edn*.

Kurotaki, D., Uede, T. and Tamura, T. (2015) 'Functions and development of red pulp macrophages', *Microbiology and Immunology*. Microbiol Immunol, 59(2), pp. 55–62. doi: 10.1111/1348-0421.12228.

Kurtz, J. (2005) 'Specific memory within innate immune systems', *Trends in Immunology*. Elsevier

Current Trends, 26(4), pp. 186–192. doi: 10.1016/j.it.2005.02.001.

Kwon, M. *et al.* (2005) 'S100A10, annexin A2, and annexin a2 heterotetramer as candidate plasminogen receptors', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. Front Biosci, 10(1), pp. 300–325. doi: 10.2741/1529.

Lamba, D. *et al.* (1996) 'The 2.3 A crystal structure of the catalytic domain of recombinant two-chain human tissue-type plasminogen activator', *Journal of molecular biology*. J Mol Biol, 258(1), pp. 117–135. doi: 10.1006/JMBI.1996.0238.

Lambert, C. *et al.* (2017) 'Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry', *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. John Wiley & Sons, Ltd, 92(3), pp. 180–188. doi: 10.1002/cyto.b.21280.

Lane, D. A., Philippou, H. and Huntington, J. A. (2005) 'Directing thrombin', *Blood*. American Society of Hematology, 106(8), pp. 2605–2612. doi: 10.1182/blood-2005-04-1710.

Lavin, Y. *et al.* (2014) 'Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment', *Cell*. Cell, 159(6), pp. 1312–1326. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.018.

Leal Rojas, I. M. *et al.* (2017) 'Human blood cD1c+ dendritic cells promote Th1 and Th17 effector function in memory cD4+ T cells', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 8(AUG), p. 971. doi: 10.3389/FIMMU.2017.00971/BIBTEX.

Lechmann, M. *et al.* (2002) 'CD83 on dendritic cells: More than just a marker for maturation', *Trends in Immunology*, 23(6), pp. 273–275. doi: 10.1016/S1471-4906(02)02214-7.

Lee, H. Y. *et al.* (2007) 'Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons', *Journal of neurochemistry*. J Neurochem, 101(5), pp. 1236–1247. doi: 10.1111/J.1471-4159.2007.04417.X.

Lee, J. *et al.* (2017) 'Lineage specification of human dendritic cells is marked by IRF8 expression in hematopoietic stem cells and multipotent progenitors', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 18(8), pp. 877–888. doi: 10.1038/ni.3789.

Lee, S. J. *et al.* (2002) 'Mannose Receptor-Mediated Regulation of Serum Glycoprotein Homeostasis', *Science*. Science, 295(5561), pp. 1898–1901. doi: 10.1126/science.1069540.

Lenschow, D. J. *et al.* (1992) 'Long-Term Survival of Xenogeneic Pancreatic Islet Grafts Induced by

CTLA41g', *Science*, 257, pp. 789–792. doi: 10.2307/2413058.

Lenschow, D. J. *et al.* (1993) 'Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 90(23), pp. 11054–11058. doi: 10.1073/PNAS.90.23.11054.

Lescoat, A. *et al.* (2020) 'Combined anti-fibrotic and anti-inflammatory properties of JAK-inhibitors on macrophages *in vitro* and *in vivo*: Perspectives for scleroderma-associated interstitial lung disease', *Biochemical Pharmacology*. Biochem Pharmacol, 178, p. 114103. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114103.

Levi, M. (2010) 'The coagulant response in sepsis and inflammation', *Hamostaseologie*. Hamostaseologie, 30(1), pp. 10–16. doi: 10.1055/s-0037-1617143.

Levin, E. G., Santell, L. and Osborn, K. G. (1997) 'The expression of endothelial tissue plasminogen activator *in vivo*: a function defined by vessel size and anatomic location', *Journal of cell science*. J Cell Sci, 110 (Pt 2)(2), pp. 139–148. doi: 10.1242/jcs.110.2.139.

Lewis, K. L. *et al.* (2011) 'Notch2 Receptor Signaling Controls Functional Differentiation of Dendritic Cells in the Spleen and Intestine', *Immunity*. Cell Press, 35(5), pp. 780–791. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2011.08.013.

Lewis, S. M., Williams, A. and Eisenbarth, S. C. (2019) 'Structure and function of the immune system in the spleen', *Science Immunology*. American Association for the Advancement of Science, 4(33). doi: 10.1126/sciimmunol.aau6085.

Li, Q. and Verma, I. M. (2002) 'NF-κB regulation in the immune system', *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol, 2(10), pp. 725–734. doi: 10.1038/nri910.

Li, X. *et al.* (2010) 'Plasmin Triggers Chemotaxis of Monocyte-Derived Dendritic Cells Through an Akt2-Dependent Pathway and Promotes a T-Helper Type-1 Response', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 30(3), pp. 582–590. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.202044.

Li, X., Syrovets, T. and Simmet, T. (2012) 'The Serine Protease Plasmin Triggers Expression of the CC-Chemokine Ligand 20 in Dendritic Cells via Akt/NF- κ B-Dependent Pathways', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. J Biomed Biotechnol, 2012, pp. 1–10. doi: 10.1155/2012/186710.

Lim, Y. *et al.* (2003) 'Correlation between Mortality and the Levels of Inter-Alpha Inhibitors in the Plasma of Patients with Severe Sepsis', *The Journal of Infectious Diseases*. Oxford Academic, 188(6), pp. 919–926. doi: 10.1086/377642.

Lin, H.-H. *et al.* (2005) 'The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 201(10), pp. 1615–1625. doi: 10.1084/jem.20042307.

Lin, L. *et al.* (2017) 'Tissue-type plasminogen activator modulates macrophage M2 to M1 phenotypic change through annexin A2-mediated NF-κB pathway', *Oncotarget*. Impact Journals, 8(50), pp. 88094–88103. doi: 10.18632/ONCOTARGET.21510.

Lin, L., Jin, Y. and Hu, K. (2015) 'Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) Promotes M1 Macrophage Survival through p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) and p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathway', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 290(12), pp. 7910–7917. doi: 10.1074/JBC.M114.599688.

Lin, L., Wu, C. and Hu, K. (2012) 'Tissue plasminogen activator activates NF-κB through a pathway involving annexin A2/CD11b and integrin-linked kinase', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. J Am Soc Nephrol, 23(8), pp. 1329–1338. doi: 10.1681/ASN.2011111123.

Linsley, P. S., Clark, E. A. and Ledbetter, J. A. (1990) 'T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87(13), pp. 5031–5035. doi: 10.1073/pnas.87.13.5031.

Liot, G. *et al.* (2006) 'Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity', *Journal of neurochemistry*. J Neurochem, 98(5), pp. 1458–1464. doi: 10.1111/J.1471-4159.2006.03982.X.

Lippens, C. *et al.* (2016) 'IDO-orchestrated crosstalk between pDCs and Tregs inhibits autoimmunity', *Journal of Autoimmunity*. J Autoimmun, 75, pp. 39–49. doi: 10.1016/j.jaut.2016.07.004.

Liu, G. *et al.* (2006) 'The macrophage heterogeneity: Difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophages', *Journal of Cellular Physiology*, 209(2), pp. 341–352. doi: 10.1002/jcp.20732.

Liu, Y. (2011) 'Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis', *Nature Reviews Nephrology*, 7(12), pp. 684–696. doi: 10.1038/nrneph.2011.149.

Locati, M., Curtale, G. and Mantovani, A. (2020) 'Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, pp. 123–147. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.

Lockwood, C. J. and Schatz, F. (1996) 'A biological model for the regulation of peri-implantational hemostasis and menstruation', *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. J Soc Gynecol Investig, 3(4), pp. 159–165. doi: 10.1016/1071-5576(96)00005-6.

Long, A. T. *et al.* (2016) 'Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. J Thromb Haemost, 14(3), pp. 427–437. doi: 10.1111/jth.13235.

Lopez-Atalaya, J. P. *et al.* (2008) 'Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. J Cereb Blood Flow Metab, 28(6), pp. 1212–1221. doi: 10.1038/JCBFM.2008.14.

Louessard, M. *et al.* (2016) 'Tissue Plasminogen Activator Expression Is Restricted to Subsets of Excitatory Pyramidal Glutamatergic Neurons', *Molecular Neurobiology*. Mol Neurobiol, 53(7), pp. 5000–5012. doi: 10.1007/s12035-015-9432-7.

Lubbers, R. *et al.* (2017) 'Production of complement components by cells of the immune system', *Clinical and Experimental Immunology*. Clin Exp Immunol, 188(2), pp. 183–194. doi: 10.1111/cei.12952.

Lucas, T. *et al.* (2010) 'Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 184(7), pp. 3964–3977. doi: 10.4049/jimmunol.0903356.

Maas, C. (2019) 'Plasminflammation—An emerging pathway to bradykinin production', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 10(AUG), p. 2046. doi: 10.3389/FIMMU.2019.02046/BIBTEX.

Maas, C. and Renne, T. (2018) 'Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation', *Blood*. American Society of Hematology, 131(17), pp. 1903–1909. doi: 10.1182/BLOOD-2017-04-569111.

Macfarlane, R. G. (1964) 'An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function

as a Biochemical Amplifier', *Nature*. Nature Publishing Group, 202(4931), pp. 498–499. doi: 10.1038/202498a0.

Macrez, R. *et al.* (2016) 'Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Brain : a journal of neurology*. Brain, 139(Pt 9), pp. 2406–2419. doi: 10.1093/BRAIN/AWW172.

Mahon, O. R. *et al.* (2020) 'Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals alter immune cell metabolism and promote M1 macrophage polarization', *Osteoarthritis and Cartilage*. Osteoarthritis Cartilage, 28(5), pp. 603–612. doi: 10.1016/j.joca.2019.10.010.

Manches, O. *et al.* (2008) 'HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase–dependent mechanism', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 118(10), pp. 3431–3439. doi: 10.1172/JCI34823.

Mansuy, I. M. *et al.* (1993) 'Variable and multiple expression of Profease Nexin-1 during mouse organogenesis and nervous system development', *Development*, 119(4), pp. 1119–1134. doi: 10.1242/dev.119.4.1119.

Mantovani, A. *et al.* (2002) 'Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes', *Trends in Immunology*. Trends Immunol, 23(11), pp. 549–555. doi: 10.1016/S1471-4906(02)02302-5.

Mantovani, A. *et al.* (2004) 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends in Immunology*. Trends Immunol, 25(12), pp. 677–686. doi: 10.1016/j.it.2004.09.015.

Mantuano, E. *et al.* (2017) 'Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity', *Blood*. Blood, 130(11), pp. 1364–1374. doi: 10.1182/blood-2017-04-780205.

Maraskovsky, E. *et al.* (1996) 'Dramatic increase in the number of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: Multiple dendritic cell subpopulations identified', *Journal of Experimental Medicine*, 184(5), pp. 1953–1962. doi: 10.1084/jem.184.5.1953.

Martinez, F. O. and Gordon, S. (2014) 'The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment', *F1000Prime Reports*. F1000Prime Rep, 6. doi: 10.12703/P6-13.

Matafonov, A. *et al.* (2014) 'Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate

thrombosis model', *Blood*, 123(11), pp. 1739–1746. doi: 10.1182/blood-2013-04-499111.

Matys, T. *et al.* (2003) 'Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage', *Nature medicine*. Nat Med, 9(4), pp. 371–373. doi: 10.1038/NM0403-371.

Maximow, A. (1909) 'Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere.', *Folia Haematologica*.

Mayadas, T. N. *et al.* (1993) 'Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice', *Cell*, 74(3), pp. 541–554. doi: 10.1016/0092-8674(93)80055-J.

McGarry, M. P. and Stewart, C. C. (1991) 'Murine Eosinophil Granulocytes Bind the Murine Macrophage-Monocyte Specific Monoclonal Antibody F4/80', *Journal of Leukocyte Biology*. J Leukoc Biol, 50(5), pp. 471–478. doi: 10.1002/jlb.50.5.471.

McKenna, H. J. *et al.* (2000) 'Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells', *Blood*. Content Repository Only!, 95(11), pp. 3489–3497. doi: 10.1182/BLOOD.V95.11.3489.

Mcknight, A. J. and Gordon, S. (1996) 'EGF-TM7: a novel subfamily of seven-transmembrane-region leukocyte cell-surface molecules', *Immunology Today*. Immunol Today, 17(6), pp. 283–287. doi: 10.1016/0167-5699(96)80546-9.

McKnight, A. J. and Gordon, S. (1998) 'The EGF-TM7 family: Unusual structures at the leukocyte surface', *Journal of Leukocyte Biology*. J Leukoc Biol, pp. 271–280. doi: 10.1002/jlb.63.3.271.

Mebius, R. E. and Kraal, G. (2005) 'Structure and function of the spleen', *Nature reviews. Immunology*. Nat Rev Immunol, 5(8), pp. 606–616. doi: 10.1038/NRI1669.

Medbury, H. *et al.* (2013) 'Differing association of macrophage subsets with atherosclerotic plaque stability', *International angiology*. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23435395/ (Accessed: 22 November 2021).

Medzhitov, R. and Janeway, C. A. (1997) 'Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition', *Cell*. Cell Press, 91(3), pp. 295–298. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80412-2.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C. A. (1997) 'A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity', *Nature*, 388(6640), pp. 394–397. doi: 10.1038/41131.

Megjugorac, N. J., Gallagher, G. E. and Gallagher, G. (2009) 'Modulation of human plasmacytoid DC function by IFN-λ1 (IL-29)', *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley & Sons, Ltd, 86(6), pp. 1359–1363. doi: 10.1189/jlb.0509347.

Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001) 'Dendritic Cells: Specialized and regu- lated antigen processing machines.', *Cell*. Cell, 106(3), pp. 255–258. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00449-4.

Meneses, G. *et al.* (2019) 'Sepsis: developing new alternatives to reduce neuroinflammation and attenuate brain injury', *Annals of the New York Academy of Sciences*. Ann N Y Acad Sci, 1437(1), pp. 43–56. doi: 10.1111/NYAS.13985.

Merad, M. *et al.* (2013) 'The dendritic cell lineage: Ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting', *Annual Review of Immunology*, 31, pp. 563–604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950.

Metlay, B. Y. J. P. *et al.* (1990) 'The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies', 171(May).

Mildner, A. and Jung, S. (2014) 'Development and function of dendritic cell subsets', *Immunity*. Immunity, 40(5), pp. 642–656. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2014.04.016.

Mills, C. (2012) 'M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease', *Critical Reviews in Immunology*, 32(6), pp. 463–488. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10.

Mills, C. D. *et al.* (2000) 'M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 164(12), pp. 6166–6173. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166.

Mily, A. *et al.* (2020) 'Polarization of M1 and M2 Human Monocyte-Derived Cells and Analysis with Flow Cytometry upon Mycobacterium tuberculosis Infection', *Journal of Visualized Experiments*. J Vis Exp, 2020(163), pp. 1–20. doi: 10.3791/61807.

Mittelstadt, P. R. and Ashwell, J. D. (1999) 'Role of Egr-2 in Up-regulation of Fas Ligand in Normal T Cells and Aberrant Double-negative lpr and gld T Cells', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 274(5), pp. 3222–3227. doi: 10.1074/jbc.274.5.3222.

Mizrachi, T. *et al.* (2020) 'Role of tissue plasminogen activator in clinical aggravation of experimental autoimmune encephalomyelitis and its therapeutic potential', *Cellular Immunology*. Cell Immunol, 348, p. 104040. doi: 10.1016/j.cellimm.2020.104040.

Moore, M. A. S. and Metcalf, D. (1970) 'Ontogeny of the Haemopoietic System: Yolk Sac Origin of *In vivo* and *In vitro* Colony Forming Cells in the Developing Mouse Embryo', *British Journal of Haematology*. Br J Haematol, 18(3), pp. 279–296. doi: 10.1111/j.1365-2141.1970.tb01443.x.

Moraes-Pinto, M. I. de, Suano-Souza, F. and Aranda, C. S. (2021) 'Immune system: development and acquisition of immunological competence', *Jornal de Pediatria*. Sociedade Brasileira de Pediatria, 97, pp. S59–S66. doi: 10.1016/j.jped.2020.10.006.

Mosmann, T. *et al.* (1986) 'Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.', *The Journal of Immunology*.

Movita, D. *et al.* (2012) 'Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages', *Journal of Leukocyte Biology*. J Leukoc Biol, 92(4), pp. 723–733. doi: 10.1189/jlb.1111566.

Mukherjee, S., Huda, S. and Sinha Babu, S. P. (2019) 'Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review', *Scandinavian Journal of Immunology*. Scand J Immunol, 90(1). doi: 10.1111/sji.12771.

Munakata, S. *et al.* (2015) 'Inhibition of Plasmin Protects Against Colitis in Mice by Suppressing Matrix Metalloproteinase 9–Mediated Cytokine Release From Myeloid Cells', *Gastroenterology*. Elsevier, Inc, 148(3), pp. 565-578.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.001.

Murray, P. J. *et al.* (2014) 'Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines', *Immunity*. Immunity, 41(1), pp. 14–20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.

Murray, P. J. (2016) 'Amino acid auxotrophy as a system of immunological control nodes', *Nature Immunology*, 17(2), pp. 132–139. doi: 10.1038/ni.3323.

Murray, P. J. and Wynn, T. A. (2011) 'Protective and pathogenic functions of macrophage subsets', *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol, 11(11), pp. 723–737. doi: 10.1038/nri3073.

Nahrendorf, M. and Swirski, F. K. (2016) 'Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function', *Circulation Research*. Circ Res, 119(3), pp. 414–417. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309194.

Naik, S. H. *et al.* (2013) 'Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors', *Nature*. Nature, 496(7444), pp. 229–232. doi: 10.1038/nature12013.

Nakano, H. *et al.* (2009) 'Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate

acute T helper type 1 immune responses', *Nature immunology*. Nat Immunol, 10(4), pp. 394–402. doi: 10.1038/NI.1707.

Nakano, H. *et al.* (2013) 'Migratory properties of pulmonary dendritic cells are determined by their developmental lineage', *Mucosal immunology*. Mucosal Immunol, 6(4), pp. 678–691. doi: 10.1038/MI.2012.106.

Nathan, C. F. and Hibbs, J. B. (1991) 'Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity', *Current Opinion in Immunology*. Curr Opin Immunol, 3(1), pp. 65–70. doi: 10.1016/0952-7915(91)90079-G.

Netea, M. G. *et al.* (2019) 'Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens', *Cell Host & Microbe*. Cell Host Microbe, 25(1), pp. 13–26. doi: 10.1016/j.chom.2018.12.006.

Nicholl, S. M. *et al.* (2005) 'Plasmin Induces Smooth Muscle Cell Proliferation1,2', *Journal of Surgical Research*. J Surg Res, 127(1), pp. 39–45. doi: 10.1016/j.jss.2005.03.004.

Nicole, O. *et al.* (2001) 'The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling', *Nature medicine*. Nat Med, 7(1). doi: 10.1038/83358.

Nolan, A. *et al.* (2009) 'Differential Role for CD80 and CD86 in the Regulation of the Innate Immune Response in Murine Polymicrobial Sepsis', *PLoS ONE*. Edited by D. Unutmaz. PLoS One, 4(8), p. e6600. doi: 10.1371/journal.pone.0006600.

Noss, E. H. *et al.* (2001) 'Toll-Like Receptor 2-Dependent Inhibition of Macrophage Class II MHC Expression and Antigen Processing by 19-kDa Lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 167(2), pp. 910–918. doi: 10.4049/jimmunol.167.2.910.

O'Carroll, C. *et al.* (2014) 'Identification of a Unique Hybrid Macrophage-Polarization State following Recovery from Lipopolysaccharide Tolerance', *The Journal of Immunology*, 192(1), pp. 427–436. doi: 10.4049/jimmunol.1301722.

O'Keeffe, M. *et al.* (2002) 'Mouse plasmacytoid cells: Long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8- dendritic cells only after microbial stimulus', *Journal of Experimental Medicine*, 196(10), pp. 1307–1319. doi: 10.1084/jem.20021031.

O'Sullivan, B. and Thomas, R. (2003) 'Recent advances on the role of CD40 and dendritic cells in

immunity and tolerance', *Current Opinion in Hematology*, 10(4), pp. 272–278. doi: 10.1097/00062752-200307000-00004.

Ogle, C. K. *et al.* (1994) 'Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, AND IL-6', *Inflammation*. Inflammation, 18(5), pp. 511–523. doi: 10.1007/BF01560698.

Oishi, Y. and Manabe, I. (2018) 'Macrophages in inflammation, repair and regeneration', *The Japanese Society for Immunology*. doi: 10.1093/intimm/dxy054/5079207.

Okabe, Y. and Medzhitov, R. (2014) 'Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages', *Cell*. Cell, 157(4), pp. 832–844. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.016.

Okajima, K. (2001) 'Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants', *Immunological reviews*. Immunol Rev, 184, pp. 258–274. doi: 10.1034/J.1600-065X.2001.1840123.X.

Orecchioni, M. *et al.* (2019) 'Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS–) vs. Alternatively Activated Macrophages', *Frontiers in Immunology*. Front Immunol, 10(MAY). doi: 10.3389/fimmu.2019.01084.

Palta, S., Saroa, R. and Palta, A. (2014) 'Overview of the coagulation system', *Indian Journal of Anaesthesia*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 58(5), p. 515. doi: 10.4103/0019-5049.144643.

Patel, A. A., Ginhoux, F. and Yona, S. (2021) 'Monocytes, macrophages, dendritic cells and neutrophils: an update on lifespan kinetics in health and disease', *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd, 163(3), pp. 250–261. doi: 10.1111/imm.13320.

Paul, J., Strickland, S. and Melchor, J. P. (2007) 'Fibrin deposition accelerates neurovascular damage and neuroinflammation in mouse models of Alzheimer's disease', *Journal of Experimental Medicine*, 204(8), pp. 1999–2008. doi: 10.1084/jem.20070304.

Pawlak, R. and Strickland, S. (2002) 'Tissue plasminogen activator and seizures: a clot-buster's secret life', *The Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 109(12), p. 1529. doi: 10.1172/JCI15961.

Pawlinski, R. *et al.* (2003) 'Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a

mouse endotoxemia model', *Blood*. Blood, 101(10), pp. 3940–3947. doi: 10.1182/blood-2002-07-2303.

Pennica, D. *et al.* (1983) 'Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli', *Nature*. Nature Publishing Group, 301(5897), pp. 214–221. doi: 10.1038/301214a0.

Pilones, K. A. *et al.* (2020) 'IL15 synergizes with radiotherapy to reprogram the tumor immune contexture through a dendritic cell connection', *OncoImmunology*. Oncoimmunology, 9(1). doi: 10.1080/2162402X.2020.1790716.

Plantinga, M. *et al.* (2013) 'Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen', *Immunity*. Immunity, 38(2), pp. 322–335. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2012.10.016.

Plow, E. F., Doeuvre, L. and Das, R. (2012) 'So Many Plasminogen Receptors: Why?', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. J Biomed Biotechnol, 2012, pp. 1–6. doi: 10.1155/2012/141806.

Polavarapu, R. *et al.* (2007) 'Tissue-type plasminogen activator–mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor–related protein increases the permeability of the neurovascular unit', *Blood*. American Society of Hematology, 109(8), pp. 3270–3278. doi: 10.1182/BLOOD-2006-08-043125.

Poltorak, A. *et al.* (1998) 'Genetic and Physical Mapping of the Lps Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region', *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. Academic Press, 24(3), pp. 340–355. doi: 10.1006/bcmd.1998.0201.

Pool, L., Rivollier, A. and Agace, W. W. (2020) 'Deletion of IRF4 in Dendritic Cells Leads to Delayed Onset of T Cell–Dependent Colitis', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 204(4), pp. 1047–1055. doi: 10.4049/jimmunol.1900775.

Poole, J. A. *et al.* (2012) 'CD11c + /CD11b + Cells Are Critical for Organic Dust–Elicited Murine Lung Inflammation', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Am J Respir Cell Mol Biol, 47(5), pp. 652–659. doi: 10.1165/rcmb.2012-0095OC.

Posma, J. J. N., Posthuma, J. J. and Spronk, H. M. H. (2016) 'Coagulation and non-coagulation effects of thrombin', *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. J Thromb Haemost, 14(10), pp. 1908–1916. doi: 10.1111/JTH.13441.

Potzeha, F. (2021) *Le potentiel thérapeutique des vésicules extracellulaires hémostatiques pour le traitement ciblé des hémorragies intracérébrales : de la production à grande échelle aux tests dans des moldèles pré-cliniques*.

Puhr, S. *et al.* (2015) 'Dendritic cell development—History, advances, and open questions', *Seminars in Immunology*. Academic Press, 27(6), pp. 388–396. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.012.

Qian, C. and Cao, X. (2018) 'Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation', *Seminars in Immunology*, 35(August), pp. 3–11. doi: 10.1016/j.smim.2017.12.002.

Raes, G. *et al.* (2005) 'Arginase-1 and Ym1 Are Markers for Murine, but Not Human, Alternatively Activated Myeloid Cells', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 174(11), pp. 6561–6562. doi: 10.4049/jimmunol.174.11.6561.

Rath, M. *et al.* (2014) 'Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 5(OCT), p. 532. doi: 10.3389/FIMMU.2014.00532/BIBTEX.

Razi-Wolf, Z. *et al.* (1992) 'Expression and function of the murine B7 antigen, the major costimulatory molecule expressed by peritoneal exudate cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(9), pp. 4210–4214. doi: 10.1073/pnas.89.9.4210.

Raziyeva, K. *et al.* (2021) 'Immunology of Acute and Chronic Wound Healing', *Biomolecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 11(5), p. 700. doi: 10.3390/biom11050700.

Reeves, R. K. *et al.* (2012) 'SIV Infection Induces Accumulation of Plasmacytoid Dendritic Cells in the Gut Mucosa', *Journal of Infectious Diseases*. Oxford Academic, 206(9), pp. 1462–1468. doi: 10.1093/infdis/jis408.

Reijerkerk, A. *et al.* (2008) 'Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. J Immunol, 181(5), pp. 3567–3574. doi: 10.4049/JIMMUNOL.181.5.3567.

Reijerkerk, A. *et al.* (2010) 'The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier', *Journal of Neurochemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 113(2), pp. 447–453. doi: 10.1111/J.1471-4159.2010.06598.X.

Reimer-Michalski, E.-M. and Conrath, U. (2016) 'Innate immune memory in plants', *Seminars in*

Immunology. Academic Press, 28(4), pp. 319–327. doi: 10.1016/j.smim.2016.05.006.

Reizis, B. (2019) 'Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function', *Immunity*. Immunity, 50(1), pp. 37–50. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.027.

Renckens, R. *et al.* (2006) 'Endogenous Tissue-Type Plasminogen Activator Is Protective during Escherichia coli -Induced Abdominal Sepsis in Mice', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 177(2), pp. 1189–1196. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1189.

Renckens, R. *et al.* (2008) 'Transgenic tissue-type plasminogen activator expression improves host defense during Klebsiella pneumonia', *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. J Thromb Haemost, 6(4), pp. 660–668. doi: 10.1111/J.1538-7836.2008.02892.X.

Renné, T. *et al.* (2005) 'Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII', *Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 202(2), pp. 271–281. doi: 10.1084/jem.20050664.

Renné, T. and Stavrou, E. X. (2019) 'Roles of factor XII in innate immunity', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A., 10(AUG), p. 2011. doi: 10.3389/FIMMU.2019.02011/BIBTEX.

Rich, T., Allen, R. and Trowsdale, J. (2000) 'How low can Toll go?', *Trends in Genetics*. Elsevier Current Trends, 16(7), pp. 292–294. doi: 10.1016/S0168-9525(00)02026-6.

Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D. and Castillo Ferrer, C. (2016) 'Innate immunity in vertebrates: an overview', *Immunology*. Immunology, 148(2), pp. 125–139. doi: 10.1111/imm.12597.

Riewald, M. and Ruf, W. (2003) 'Science review: Role of coagulation protease cascades in sepsis', *Critical Care*. BioMed Central, 7(2), p. 123. doi: 10.1186/CC1825.

Rijken, D. C. *et al.* (1979) 'Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue', *BBA - Protein Structure*, 580(1), pp. 140–153. doi: 10.1016/0005-2795(79)90205-8.

Rijken, D. C. and Collen, D. (1981) 'Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture.', *Journal of Biological Chemistry*. Â© 1981 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 256(13), pp. 7035–7041. doi: 10.1016/s0021-9258(19)69095-2.

Rijken, D. C., Hoylaerts, M. and Collen, D. (1981) 'Fibrinolytic Properties of One-chain and Two-

chain Human Extrinsic (Tissue-type) Plasminogen Activator', *Journal of Biological Chemistry*. © 1982 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 257(6), pp. 2920–2925. doi: 10.1016/S0021-9258(19)81052-9.

Rijken, D. C. and Lijnen, H. R. (2009) 'New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. John Wiley & Sons, Ltd, 7(1), pp. 4–13. doi: 10.1111/J.1538-7836.2008.03220.X.

Roberts, E. W. *et al.* (2016) 'Critical Role for CD103+/CD141+ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma', *Cancer Cell*. Cell Press, 30(2), pp. 324–336. doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.003.

Rømer, J. *et al.* (1996) 'Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene', *Nature Medicine*. Nat Med, 2(3), pp. 287–292. doi: 10.1038/nm0396-287.

Rőszer, T. (2015) 'Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms', *Mediators of Inflammation*. Mediators Inflamm, 2015, pp. 1–16. doi: 10.1155/2015/816460.

Rouf, S. A., Moo-Young, M. and Chisti, Y. (1996) 'Tissue-type plasminogen activator: Characteristics, applications and production technology', *Biotechnology Advances*, 14(3), pp. 239–266. doi: 10.1016/0734-9750(96)00019-5.

Roztocil, E. *et al.* (2005) 'Plasmin-induced smooth muscle cell proliferation requires epidermal growth factor activation through an extracellular pathway', *Surgery*. Surgery, 138(2), pp. 180–186. doi: 10.1016/j.surg.2005.06.014.

Saeed, S. *et al.* (2014) 'Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity', *Science*. Science, 345(6204). doi: 10.1126/science.1251086.

Safford, M. *et al.* (2005) 'Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation', *Nature Immunology*. Nat Immunol, 6(5), pp. 472–480. doi: 10.1038/ni1193.

Samson, A. L. *et al.* (2008) 'Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance N-Methyl-D-Aspartate receptor function', *Journal of neurochemistry*. NIH Public Access, 107(4), p. 1091. doi: 10.1111/J.1471-4159.2008.05687.X.

Sancho, D. *et al.* (2008) 'Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-

type lectin', *Journal of Clinical Investigation*. J Clin Invest, 118(6), pp. 2098–2110. doi: 10.1172/JCI34584.

Sancho, D. *et al.* (2009) 'Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity', *Nature*, 458(7240), pp. 899–903. doi: 10.1038/nature07750.

Sansom, D. M. (2000) 'CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom?', *Immunology*. Immunology, 101(2), pp. 169–177. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x.

Sansom, D. M., Manzotti, C. N. and Zheng, Y. (2003) 'What's the difference between CD80 and CD86?', *Trends in Immunology*. Trends Immunol, 24(6), pp. 313–318. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00111-X.

Di Santo, J. P. (2006) 'Natural killer cell developmental pathways: A Question of Balance', *Annual Review of Immunology*. Annu Rev Immunol, 24(1), pp. 257–286. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090700.

Sappino, A. P. *et al.* (1993) 'Extracellular proteolysis in the adult murine brain', *The Journal of clinical investigation*. J Clin Invest, 92(2), pp. 679–685. doi: 10.1172/JCI116637.

Schäffer, M. *et al.* (2007) 'MHC-Class-II-Deficiency Impairs Wound Healing', *Journal of Surgical Research*. J Surg Res, 138(1), pp. 100–105. doi: 10.1016/j.jss.2006.05.029.

Schlitzer, A. *et al.* (2013) 'IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses', *Immunity*. Cell Press, 38(5), pp. 970–983. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.011.

Schmid, M. A. and Manz, M. G. (2010) 'Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment', 234, pp. 32–44.

Schraml, B. U. *et al.* (2013) 'Genetic Tracing via DNGR-1 Expression History Defines Dendritic Cells as a Hematopoietic Lineage', *Cell*. Cell Press, 154(4), pp. 843–858. doi: 10.1016/J.CELL.2013.07.014.

Schreibelt, G. *et al.* (2012) 'The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells', *Blood*, 119(10), pp. 2284–2292. doi: 10.1182/blood-2011-08-373944.

Schreiber, H. A. *et al.* (2013) 'Intestinal monocytes and macrophages are required for T cell polarization in response to Citrobacter rodentium', *The Journal of experimental medicine*. J Exp

Med, 210(10), pp. 2025–2039. doi: 10.1084/JEM.20130903.

Schroder, K. and Tschopp, J. (2010) 'The Inflammasomes', *Cell*. Cell Press, 140(6), pp. 821–832. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040.

See, P. *et al.* (2017) 'Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 356(6342). doi: 10.1126/SCIENCE.AAG3009.

Segura, E. *et al.* (2013) 'Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation', *Immunity*. Cell Press, 38(2), pp. 336–348. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2012.10.018.

Segura, E. and Amigorena, S. (2013) 'Inflammatory dendritic cells in mice and humans', *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, 34(9), pp. 440–445. doi: 10.1016/j.it.2013.06.001.

Seillet, C. and Belz, G. T. (2013) 'Terminal Differentiation of Dendritic Cells', in *Advances in Immunology*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 185–210. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00007-7.

Seillier, C. *et al.* (2022) 'Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response', *Cellular Immunology*. Cell Immunol, 371, p. 104451. doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104451.

Serbina, N. V. *et al.* (2003) 'TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection', *Immunity*. Immunity, 19(1), pp. 59–70. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00171-7.

Serbina, N. V., Shi, C. and Pamer, E. G. (2012) 'Monocyte-mediated immune defense against murine listeria monocytogenes infection', in *Advances in Immunology*. 1st edn. Elsevier Inc., pp. 119–134. doi: 10.1016/B978-0-12-394590-7.00003-8.

Shapouri-Moghaddam, A. *et al.* (2018) 'Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease', *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 233(9), pp. 6425–6440. doi: 10.1002/jcp.26429.

Sheng, J. *et al.* (2017) 'A Discrete Subset of Monocyte-Derived Cells among Typical Conventional Type 2 Dendritic Cells Can Efficiently Cross-Present', *Cell Reports*. ElsevierCompany., 21(5), pp. 1203–1214. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.024.

Sherwood, E. R. and Toliver-Kinsky, T. (2004) 'Mechanisms of the inflammatory response', *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 18(3), pp. 385–405. doi: 10.1016/j.bpa.2003.12.002.

Shi, K. *et al.* (2019) 'Global brain inflammation in stroke', *The Lancet Neurology*. Lancet Neurol, 18(11), pp. 1058–1066. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30078-X.

Shimazu, H. *et al.* (2017) 'Pharmacological targeting of plasmin prevents lethality in a murine model of macrophage activation syndrome', *Blood*. Content Repository Only!, 130(1), pp. 59–72. doi: 10.1182/BLOOD-2016-09-738096.

Shin, C. Y., Kundel, M. and Wells, D. G. (2004) 'Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA translation', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. J Neurosci, 24(42), pp. 9425–9433. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2457-04.2004.

Shortman, K. and Heath, W. R. (2010) 'The CD8+ dendritic cell subset', *Immunological Reviews*, 234(1), pp. 18–31. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x.

Shrivastava, S., McVey, J. H. and Dorling, A. (2007) 'The Interface Between Coagulation and Immunity', *American Journal of Transplantation*. Am J Transplant, 7(3), pp. 499–506. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01653.x.

Siao, C. J. and Tsirka, S. E. (2002) 'Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. J Neurosci, 22(9), pp. 3352–3358. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-09-03352.2002.

Smole, U., Kratzer, B. and Pickl, W. F. (2020) 'Soluble pattern recognition molecules: Guardians and regulators of homeostasis at airway mucosal surfaces', *European Journal of Immunology*. Wiley-Blackwell, 50(5), pp. 624–642. doi: 10.1002/eji.201847811.

Soreq, H. and Miskin, R. (1981) 'Plasminogen activator in the rodent brain', *Brain research*, 216(2), pp. 361–374.

Spoel, S. H. and Dong, X. (2012) 'How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 12(2), pp. 89–100. doi: 10.1038/nri3141.

Sprengers, E. and Kluft, C. (1987) 'Plasminogen Activator Inhibitors', *Blood*. Content Repository Only!, 69(2), pp. 381–387. doi: 10.1182/BLOOD.V69.2.381.381.

Springer, T. *et al.* (1979) 'Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal

antibody', *European Journal of Immunology*. Eur J Immunol, 9(4), pp. 301–306. doi: 10.1002/eji.1830090410.

Stables, M. J. *et al.* (2011) 'Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages', *Blood*. Blood, 118(26), pp. e192–e208. doi: 10.1182/blood-2011-04-345330.

Stacey, M. *et al.* (2003) 'The epidermal growth factor–like domains of the human EMR2 receptor mediate cell attachment through chondroitin sulfate glycosaminoglycans', *Blood*. American Society of Hematology, 102(8), pp. 2916–2924. doi: 10.1182/blood-2002-11-3540.

Stary, G. *et al.* (2009) 'Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4+ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients', *Blood*. Content Repository Only!, 114(18), pp. 3854–3863. doi: 10.1182/BLOOD-2009-04-217927.

Steeg, P. S., Johnson, H. M. and Oppenheim, J. J. (1982) 'Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine: Inhibitory effect of endotoxin', *The Journal of Immunology*, 129(6), pp. 2402–2406.

Steinman, R. M. (1991) 'The Dendritic Cell System and its Role in Immunogenicity', *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 9(1), pp. 271–296. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415.

Steinman, R. M. and Cohn, Z. A. (1973) 'Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 137(5), pp. 1142–1162. doi: 10.1084/jem.137.5.1142.

Steinman, R. M. and Witmer, M. D. (1978) 'Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 75(10), pp. 5132–5136. doi: 10.1073/pnas.75.10.5132.

Stephenson, D. A. *et al.* (2006) 'Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. J Immunol, 177(4), pp. 2115–2122. doi: 10.4049/JIMMUNOL.177.4.2115.

Stevenson, T. K. and Lawrence, D. A. (2018) 'Characterization of Tissue Plasminogen Activator Expression and Trafficking in the Adult Murine Brain', *eneuro*. eNeuro, 5(4), p. ENEURO.0119-18.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0119-18.2018.

Sturn, D. H. *et al.* (2003) 'Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils', *Blood*. Blood, 102(4), pp. 1499–1505. doi: 10.1182/blood-2002-12-3880.

Sugimoto, M. A. *et al.* (2017) 'Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1', *Blood*. Blood, 129(21), pp. 2896–2907. doi: 10.1182/blood-2016-09-742825.

Sung, S.-S. J. *et al.* (2006) ' A Major Lung CD103 (α E)-β 7 Integrin-Positive Epithelial Dendritic Cell Population Expressing Langerin and Tight Junction Proteins ', *The Journal of Immunology*, 176(4), pp. 2161–2172. doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2161.

Suzuki, Y. *et al.* (2009) 'Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein', *Blood*. American Society of Hematology, 114(15), pp. 3352–3358. doi: 10.1182/blood-2009-02-203919.

Svensson-Arvelund, J. *et al.* (2015) 'The Human Fetal Placenta Promotes Tolerance against the Semiallogeneic Fetus by Inducing Regulatory T Cells and Homeostatic M2 Macrophages', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 194(4), pp. 1534–1544. doi: 10.4049/jimmunol.1401536.

Swiecki, M. and Colonna, M. (2016) 'The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells', *Nature Reviews Immunology*, 176(1), pp. 100–106. doi: 10.1038/nri3865.The.

Syrovets, T. *et al.* (2001) 'Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKβ-mediated NF-κB activation', *Blood*. Content Repository Only!, 97(12), pp. 3941–3950. doi: 10.1182/BLOOD.V97.12.3941.

Syrovets, T., Lunov, O. and Simmet, T. (2012) 'Plasmin as a proinflammatory cell activator', *Journal of leukocyte biology*. J Leukoc Biol, 92(3), pp. 509–519. doi: 10.1189/JLB.0212056.

Syrovets, T. and Simmet, T. (2004) 'Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin', *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Cell Mol Life Sci, 61(7–8), pp. 873–885. doi: 10.1007/S00018-003-3348-5.

Szondi, D. C. *et al.* (2021) 'Arginase Signalling as a Key Player in Chronic Wound Pathophysiology and Healing', *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media SA, 8. doi: 10.3389/fmolb.2021.773866.

Tan, J. K. H. *et al.* (2011) 'Identification of a novel antigen cross-presenting cell type in spleen',

Journal of cellular and molecular medicine. J Cell Mol Med, 15(5), pp. 1189–1199. doi: 10.1111/J.1582-4934.2010.01089.X.

Tan, P. *et al.* (1993) 'Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1.', *Journal of Experimental Medicine*. J Exp Med, 177(1), pp. 165–173. doi: 10.1084/jem.177.1.165.

Tanaka, T. (2016) 'Leukocyte Adhesion Molecules', in *Encyclopedia of Immunobiology*. Elsevier, pp. 505–511. doi: 10.1016/B978-0-12-374279-7.07015-6.

Taylor, P. R. *et al.* (2003) 'Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity ex vivo', *European Journal of Immunology*. Eur J Immunol, 33(8), pp. 2090–2097. doi: 10.1002/eji.200324003.

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995) 'Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke', *The New England journal of medicine*. N Engl J Med, 333(24), pp. 1581–1588. doi: 10.1056/NEJM199512143332401.

Thibeault, S. *et al.* (2010) 'S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability', *Molecular cell*. Mol Cell, 39(3), pp. 468–476. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2010.07.013.

Tivol, E. A. *et al.* (1995) 'Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4', *Immunity*. Cell Press, 3(5), pp. 541–547. doi: 10.1016/1074-7613(95)90125-6.

Toltl, L. J., Beaudin, S. and Liaw, P. C. (2008) 'Activated Protein C Up-Regulates IL-10 and Inhibits Tissue Factor in Blood Monocytes', *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 181(3), pp. 2165–2173. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2165.

Touyz, R. M. (2007) 'Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Thrombin', *Hypertension*. Lippincott Williams & Wilkins, 49(3), pp. 429–431. doi: 10.1161/01.HYP.0000255955.75119.1a.

Underhill, D. M. and Goodridge, H. S. (2012) 'Information processing during phagocytosis', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 12(7), pp. 492–502. doi: 10.1038/nri3244.

Vago, J. P. *et al.* (2020) 'Glucocorticoid-induced leucine zipper modulates macrophage polarization and apoptotic cell clearance', *Pharmacological Research*. Pharmacol Res, 158, p.

104842. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104842.

Vallance, P. and Chan, N. (2001) 'Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance', *Heart*. BMJ Publishing Group, 85(3), pp. 342–350. doi: 10.1136/heart.85.3.342.

Del Vecchio, A. *et al.* (2014) 'Bi-directional activation of inflammation and coagulation in septic neonates', *Early Human Development*. Elsevier Ireland Ltd, 90(SUPPL.1). doi: 10.1016/S0378-3782(14)70008-8.

Vijay, K. (2018) 'Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future', *International Immunopharmacology*. Int Immunopharmacol, 59, pp. 391–412. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.002.

Vremec, D. *et al.* (1997) 'The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs', *European Journal of Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, 27(1), pp. 40–44. doi: 10.1002/eji.1830270107.

Vremec, D. *et al.* (2000) 'CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen', *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 164(6), pp. 2978–2986. doi: 10.4049/jimmunol.164.6.2978.

Vu Manh, T. P. *et al.* (2015) 'Investigating evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation, 6(JUN), p. 260. doi: 10.3389/FIMMU.2015.00260/BIBTEX.

Wallén, P., Bergsdorf, N. and Rånby, M. (1982) 'Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin', *Biochimica et biophysica acta*. Biochim Biophys Acta, 719(2), pp. 318–328. doi: 10.1016/0304-4165(82)90105-2.

Walunas, T. L. *et al.* (1994) 'CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation', *Immunity*. Immunity, 1(5), pp. 405–413. doi: 10.1016/1074-7613(94)90071-X.

Wang, J. *et al.* (2014) 't-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte–endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis', *Clinical Immunology*. Academic Press, 152(1–2), pp. 90–100. doi: 10.1016/j.clim.2014.03.004.

Wang, S. *et al.* (2006) 'Reduction of Tissue Plasminogen Activator-Induced Matrix Metalloproteinase-9 by Simvastatin in Astrocytes', *Stroke*. Stroke, 37(7), pp. 1910–1912. doi:

10.1161/01.STR.0000226923.48905.39.

Warschkau, H. and Kiderlen, A. F. (1999) 'A monoclonal antibody directed against the murine macrophage surface molecule F4/80 modulates natural immune response to Listeria monocytogenes.', *Journal of immunology*, 163(6), pp. 3409–16. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477612.

Waskow, C. *et al.* (2008) 'The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues', *Nature Immunology 2008 9:6*. Nature Publishing Group, 9(6), pp. 676–683. doi: 10.1038/ni.1615.

Wasserman, S. A. (2000) 'Toll signaling: the enigma variations', *Current Opinion in Genetics & Development*. Elsevier Current Trends, 10(5), pp. 497–502. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00118-0.

Watanabe, S. *et al.* (2019) 'The role of macrophages in the resolution of inflammation', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 129(7), pp. 2619–2628. doi: 10.1172/JCI124615.

Waterhouse, P. *et al.* (2011) 'Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctla-4', *Science*, 270(5238), pp. 985–988. Available at: https://science.sciencemag.org/content/332/6029/600.

Weimar, W. *et al.* (1981) 'Specific Lysis of an Iliofemoral Thrombus By Administration of Extrinsic (Tissue-Type) Plasminogen Activator', *The Lancet*, 318(8254), pp. 1018–1020. doi: 10.1016/S0140-6736(81)91217-4.

Wheeler, A. P. and Gailani, D. (2016) 'The Intrinsic Pathway of Coagulation as a Target for Antithrombotic Therapy', *Hematol Oncol Clin North Am*. doi: 10.1016/j.hoc.2016.05.007.The.

Williams, J. W. *et al.* (2018) 'Macrophage Biology, Classification, and Phenotype in Cardiovascular Disease', *Journal of the American College of Cardiology*, 72(18), pp. 2166–2180. doi: 10.1016/j.jacc.2018.08.2148.

Wing, J. B., Tay, C. and Sakaguchi, S. (2019) 'Control of Regulatory T Cells by Co-signal Molecules', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 179–210. doi: 10.1007/978-981-32-9717-3_7.

Witherel, C. E. *et al.* (2021) 'Regulation of extracellular matrix assembly and structure by hybrid M1/M2 macrophages', *Biomaterials*. Biomaterials, 269, p. 120667. doi:

10.1016/j.biomaterials.2021.120667.

Wu, J. *et al.* (2018) 'Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 115(26), pp. 6786–6791. doi: 10.1073/PNAS.1805542115/-/DCSUPPLEMENTAL.

Wu, J. Z. *et al.* (1993) 'A comparison of hepatic, splenic, peritoneal and alveolar macrophages with respect to PGE2, TXB2, production and ADCC function', *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 48(2), pp. 149–153. doi: 10.1016/0952-3278(93)90103-4.

Wynn, T. A. and Vannella, K. M. (2016) 'Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis', *Immunity*. Immunity, 44(3), pp. 450–462. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2016.02.015.

Xaus, J. *et al.* (2000) 'The Expression of MHC Class II Genes in Macrophages Is Cell Cycle Dependent', *The Journal of Immunology*. American Association of Immunologists, 165(11), pp. 6364–6371. doi: 10.4049/JIMMUNOL.165.11.6364.

Xu, M. *et al.* (2021) 'Phagocytosis of apoptotic endothelial cells reprograms macrophages in skin wounds', *Journal of Immunology and Regenerative Medicine*. J Immunol Regen Med, 12, p. 100038. doi: 10.1016/j.regen.2021.100038.

Yang-Feng, T. L. *et al.* (1986) 'Human tissue-type plasminogen activator gene located near chromosomal breakpoint in myeloproliferative disorder', *American Journal of Human Genetics*, 39(1), pp. 79–87.

Yaron, J. R. *et al.* (2021) 'Fibrinolytic Serine Proteases, Therapeutic Serpins and Inflammation: Fire Dancers and Firestorms', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Frontiers Media S.A., 8, p. 153. doi: 10.3389/FCVM.2021.648947/BIBTEX.

Yepes, M. and Lawrence, D. (2007) 'New Functions for an Old Enzyme: Nonhemostatic Roles for Tissue-Type Plasminogen Activator in the Central Nervous System', *ACS Chemical Biology*, 2(12), p. 762. doi: 10.1021/cb700242h.

Yetim, M. (2021) *Rôle neurovasculaire de l'activateur tissulaire du plasminogène*.

Yokochi, T., Holly, R. D. and Clark, E. A. (1982) 'B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-

Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas', *Journal of immunology*.

Yona, S. *et al.* (2013) 'Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis', *Immunity*. Immunity, 38(1), pp. 79–91. doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001.

Yuan, H. *et al.* (2009) 'The Serine Protease Plasmin Cleaves the Amino-terminal Domain of the NR2A Subunit to Relieve Zinc Inhibition of the N-Methyl-d-aspartate Receptors', *The Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 284(19), p. 12862. doi: 10.1074/JBC.M805123200.

Zalfa, C. *et al.* (2019) 'Tissue-type plasminogen activator neutralizes LPS but not protease-activated receptor-mediated inflammatory responses to plasmin', *Journal of leukocyte biology*. J Leukoc Biol, 105(4), pp. 729–740. doi: 10.1002/JLB.3A0818-329RRR.

Zaynagetdinov, R. *et al.* (2013) 'Identification of Myeloid Cell Subsets in Murine Lungs Using Flow Cytometry', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Am J Respir Cell Mol Biol, 49(2), pp. 180–189. doi: 10.1165/rcmb.2012-0366MA.

Zhang, C. *et al.* (2009) 'Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. J Cereb Blood Flow Metab, 29(12), pp. 1946–1954. doi: 10.1038/JCBFM.2009.174.

Zhang, X. *et al.* (2007) 'Tissue-Type Plasminogen Activator and the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediate Cerebral Ischemia-Induced Nuclear Factor-κB Pathway Activation', *The American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 171(4), pp. 1281–1290. doi: 10.2353/ajpath.2007.070472.

Zhang, Z. *et al.* (2002) 'Adjuvant Treatment With Neuroserpin Increases the Therapeutic Window for Tissue-Type Plasminogen Activator Administration in a Rat Model of Embolic Stroke', *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins, 106(6), pp. 740–745. doi: 10.1161/01.CIR.0000023942.10849.41.

Zheng, Y. *et al.* (2004) 'CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of

Human Regulatory T Cells', *The Journal of Immunology*. J Immunol, 172(5), pp. 2778–2784. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2778.

Zheng, Z. *et al.* (2019) 'An ATF6-tPA pathway in hepatocytes contributes to systemic fibrinolysis and is repressed by DACH1', *Blood*. Blood, 133(7), pp. 743–753. doi: 10.1182/blood-2018-07-864843.

Zhou, X. *et al.* (2005) 'LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils', *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 288(4), pp. L655–L662. doi: 10.1152/ajplung.00327.2004.

Zhu, Y. *et al.* (2005) 'The ancient origin of the complement system', *The EMBO Journal*, 24(2), pp. 382–394. doi: 10.1038/sj.emboj.7600533.

Zindel, J. and Kubes, P. (2020) 'DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15(1), pp. 493–518. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847.