



HAL
open science

Modélisation de la dynamique de la réponse inflammatoire suite à un dommage tissulaire chez le mammifère adulte

Léa da Costa Fernandes

► **To cite this version:**

Léa da Costa Fernandes. Modélisation de la dynamique de la réponse inflammatoire suite à un dommage tissulaire chez le mammifère adulte. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30074 . tel-04198560

HAL Id: tel-04198560

<https://theses.hal.science/tel-04198560>

Submitted on 7 Sep 2023

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Léa DA COSTA FERNANDES

Le 21 mars 2023

Modélisation de la dynamique de la réponse inflammatoire suite à un dommage tissulaire chez le mammifère adulte.

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

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

RESTORE

Thèse dirigée par

Béatrice COUSIN et François PERES

Jury

Mme Raluca EFTIMIE, Rapporteur

M. Laurent DUBUQUOY, Rapporteur

Mme Laurence CALZONE, Rapporteur

Mme Béatrice COUSIN, Directrice de thèse

M. François PERES, Co-directeur de thèse

Mme Noélie DAVEZAC, Présidente

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire RESTORE durant la période 2019 à 2023. Dans ces premières pages, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Tout d'abord, je tiens à remercier l'Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées ainsi que la région Occitanie qui ont permis son financement.

Ce travail portant la référence EUR CARE (« *Cancer, Ageing & Rejuvenation* ») a été partiellement soutenue par la subvention EUR CARE N°ANR-18-EURE-0003 dans le cadre du Programme des Investissements d'Avenir. Ainsi, je remercie l'école doctorale CARE de leur support et accompagnement.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie pour la discussion enrichissante que nous avons eue au cours de la soutenance. J'adresse mes sincères remerciements :

À Mme Raluca Eftimie, qui m'a fait l'honneur d'être rapporteure de cette thèse. Je vous remercie pour l'ensemble des commentaires constructifs que vous avez apportés à ce travail. Chacune de vos remarques sur le modèle mathématique a permis de souligner l'intérêt de la modélisation mathématique dans le domaine de la biologie.

À M. Laurent Dubuquoy, qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail multidisciplinaire et de vos retours sur l'apport de celui-ci pour la communauté scientifique. Je vous suis reconnaissante d'avoir apporté votre vision d'immunologiste à ce travail.

À Mme Laurence Calzone, qui m'a fait l'honneur d'être rapporteure de cette thèse. Je vous remercie pour vos commentaires qui ont contribué à enrichir ma vision sur le modèle mathématique construit. Grâce à nos échanges, vous avez fait évoluer mon point de vue sur la modélisation mathématique appliquée à la biologie. Je tiens à vous remercier pour toute votre bienveillance à l'égard de ce travail.

C'est avec émotion que j'adresse mes remerciements envers toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue. J'exprime mes remerciements :

À Béatrice Cousin, qui m'a encadrée tout au long de cette thèse. Je t'exprime mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour la confiance que tu m'as accordée. Ce sujet multidisciplinaire, associant la biologie aux mathématiques et à l'informatique, m'a passionnée. Cependant, ce n'est pas toujours évident de concilier tous ces domaines et tu as été présente pour me rassurer sur le travail fourni. J'ai compris qu'un projet de recherche ne se termine jamais et que chaque réflexion et raisonnement apportés au projet sont un pas de plus. Tout au long de ce parcours j'ai pu évoluer, tant sur le plan professionnel, grâce à l'autonomie que tu m'as accordée, que sur le plan personnel, où tu m'as redonné confiance en moi lorsque j'en avais besoin. Je te suis reconnaissante pour ton engagement continu et ta rigueur scientifique enseignée. Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute ma gratitude. Ce simple Merci témoigne de ma sincère reconnaissance.

À François Pérès, qui m'a co-encadrée dans ce travail de thèse. Travailler à tes côtés m'a permis de découvrir la modélisation. J'ai d'abord découvert les réseaux bayésiens, puis ce projet m'a appris à rebondir et c'est ainsi que j'ai pu élargir mes connaissances sur les diverses approches de modélisation. Je suis reconnaissante des opportunités que tu m'as données en présentant ce travail à l'ENIT de Tarbes. Tous ces échanges étaient particulièrement enrichissants et m'ont permis de partager ma passion pour la biologie, abordée à travers la modélisation. Je tiens également à te remercier pour chaque échange que nous avons eu ainsi que tes conseils.

À Sylvain Cussat-Blanc, pour m'avoir accompagnée tout au long de ce travail de thèse en tant que membre du comité de thèse. Je tiens à exprimer toute ma gratitude pour le précieux soutien et les nombreux conseils qui ont enrichi ma réflexion scientifique et m'ont permis d'avancer de la meilleure façon possible dans ce projet. Grâce à ton expertise nous avons orienté ce projet vers une thématique d'optimisation. Je tiens également à te remercier sincèrement d'avoir accepté de siéger au jury de thèse afin de clôturer cette aventure.

À Noélie Davezac, pour m'avoir suivie tout au long de ce travail en tant que membre du comité de thèse. Je tiens à te remercier pour tes nombreux conseils et remarques pertinentes sur le projet qui ont permis de le faire avancer. Ton soutien et ta grande disponibilité ont été précieux tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir guidée et donné l'opportunité d'échanger avec des chercheurs d'horizons différents. Je tiens également à te remercier sincèrement d'avoir accepté de présider le jury de soutenance afin de clôturer ce travail.

À Yves Gourinat, pour m'avoir partagé votre vision sur les modèles mathématiques. C'est avec grand intérêt que je souhaite vous exprimer toute ma gratitude pour le temps que vous m'avez consacré. Nos échanges, d'une extrême richesse, m'ont permis d'ouvrir mon esprit scientifique.

Vous m'avez convaincue de l'intérêt que présentent ces sujets multidisciplinaires, en particulier l'importance de combiner les lois de la physique pour une meilleure compréhension des mécanismes biologiques. Merci pour tous ces échanges aussi bien scientifiques que philosophique.

À Christine Espinosa, pour vos nombreux conseils sur les équations différentielles. Chacune de nos réunions a été particulièrement constructive et je vous suis très reconnaissante pour cela. Merci pour toute votre bienveillance et l'intérêt captivant que vous avez eu en acceptant d'échanger sur le modèle mathématique. C'est avec admiration que je retiens votre enthousiasme et votre générosité.

À Diane Peurichard, pour m'avoir partagé ton expertise dans l'analyse des modèles mathématiques. Je tiens à t'adresser mes sincères remerciements pour le temps passé sur ce travail. Nos réunions m'ont énormément apportée et guidée pour analyser les équations différentielles.

À Stéphane Segond, pour vos conseils sur l'analyse des données. Je tiens également à vous remercier pour le temps que vous m'avez consacré pour répondre à mes différentes questions.

Je tiens également à remercier l'ensemble des chercheurs du laboratoire RESTORE qui ont participé à enrichir mon esprit scientifique et ma vision sur ce projet pluridisciplinaire. J'adresse tout particulièrement mes remerciements :

À Louis Casteilla, tout d'abord pour l'accueil lorsque je suis arrivée au STROMALab. Je suis particulièrement reconnaissante des nombreux échanges scientifiques que nous avons eus. Ces discussions ont notamment participé à faire évoluer mon point de vue sur ce sujet multidisciplinaire. Pour tout cela je vous remercie.

À Philippe Valet, pour votre accueil à la fois au sein de l'institut RESTORE mais aussi à l'école doctorale de CAré. Merci pour votre écoute et votre générosité.

À Paul Monsarrat et Philippe Kemoun, pour tous nos échanges. Je vous remercie pour le partage de vos expertises, mais aussi pour votre bonne humeur et vos anecdotes. Je souhaite tout particulièrement te remercier Paul pour ton soutien et les nombreuses discussions que nous avons eues sur les modèles. Je te suis reconnaissante du temps que tu m'as consacré, notamment pour la relecture du manuscrit.

À Marielle Ousset, Jenny Paupert et Audrey Carrière-Pazat, je vous remercie pour votre soutien et votre gentillesse. En particulier, je souhaite te remercier Marielle pour toutes les conversations que nous avons eues, tes nombreux conseils à la fois scientifiques mais aussi personnels, notamment durant cette dernière ligne droite.

À Childerick Severac, tu as été d'un grand soutien, surtout durant la dernière ligne droite de la thèse. Je te remercie pour ces discussions qui m'ont particulièrement aidée à prendre du recul sur l'apport de mon projet dans ce domaine scientifique. Tes conseils bienveillants et tes nombreuses paroles remplies de sagesse m'ont poussée à donner le meilleur de moi-même.

À Jacques Rouquette, pour avoir été présent et à mon écoute sur la fin de la thèse qui a été riche en émotions. Je t'adresse mes plus sincères remerciements pour ton précieux soutien et encouragements.

À l'équipe FLAMES, notamment Agnès Costes, Nicolas Espagnolle, Victorine Douin-Echinard, Lise Lefèvre et Hélène Authier pour votre accueil dans cette équipe au cours de la thèse. Merci pour votre écoute et vos remarques sur le modèle. J'espère avoir réussi à vous convaincre de l'intérêt des modèles mathématiques en immunologie. Je tiens à remercier chaleureusement Audrey Varin pour le temps que tu m'as consacré, notamment pour la relecture de la partie introductive du manuscrit. Merci pour ta franchise, tes conseils et ta bienveillance.

Outre le travail consacré dans l'avancement de ce projet de thèse, j'ai également donné des travaux dirigés à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. Cela a été une réelle opportunité d'avoir fait ces enseignements où j'ai pu développer cet attrait pour la pédagogie. Pour cela, je tiens particulièrement à remercier Anne Lorsignol, Cécile Dromard-Berthezene et Anne-Laure Colombani avec qui j'ai pu acquérir des compétences pédagogiques. Je tiens également à te remercier Cécile pour ton encadrement et ton écoute lors de l'organisation des *workshops* pour l'école doctorale CARE.

À Suzy Bignau, pour ta gentillesse et ta douceur au quotidien. Tu as toujours le sourire et une bonne humeur communicante.

À Jean-François Guillemot, pour ta bonne humeur et ton écoute. Toujours de bonnes blagues à raconter durant les pauses café ! Je te souhaite une belle continuation sur ta nouvelle île.

À Clément De Vecchi, pour l'aide que tu apportes à chaque personne du laboratoire. Je te remercie surtout d'avoir été présent et rassurant le jour de la soutenance. Merci pour ton calme et ta bonne humeur au quotidien au laboratoire mais aussi avec les collègues durant les *week-ends*.

À Khaddouj Benmoussa, Mouna Rahabi, Maylis Farno et Mélissa Parny, malgré le fait que nous avons partagé qu'un petit bout de chemin ensemble, je vous remercie de votre gentillesse. Je vous souhaite une très belle continuation.

À Margot Tertrais, pour la douceur que tu apportes dans cet institut. Tu es toujours de bons conseils et d'un calme légendaire. Merci de m'avoir fait partager ton expérience. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

À Ophélie Pereira, pour ta gentillesse et générosité. Les m&m's durant la période de rédaction ont été d'un réconfort indescriptible ! Je te souhaite une bonne continuation dans ta prochaine aventure et surtout que tu t'épanouisses. Tu le mérites amplement.

À Mylène Tajan, Céline Saint-Laurent et Mélanie Gadelorge, pour toutes les conversations que nous avons eues ainsi que vos conseils.

Je souhaite remercier l'ensemble des doctorants et post-doctorants pour avoir contribué à faire de cette aventure une belle histoire. Merci d'avoir créé un environnement de travail inspirant, dynamique et d'avoir apporté de la bonne humeur au quotidien. J'adresse mes remerciements :

À mes camarades modélisateurs. Je souhaite remercier cette petite équipe avec qui j'ai pu échanger sur mon projet. Merci à Emmanuel Doumard pour ton écoute et de m'avoir partagé ton expertise sur le *machine learning*. Merci à Emma Grandgirard pour tes conseils lors de la préparation de la soutenance. Merci à Clémence Bolut d'avoir été à mon écoute pour m'expliquer certaines notions qui m'échappaient. Merci pour ton soutien, ta gentillesse et ta volonté à toujours vouloir aider les autres. Je te souhaite une belle réussite pour la suite ! Merci à Pauline Chassonnery, d'avoir été présente et surtout pour ton soutien. On en aura passé des heures à discuter... merci les équations différentielles ! C'était un réel plaisir de pouvoir échanger avec toi, d'apprendre des notions que je n'avais pas. Je suis convaincue que tu feras une magnifique thèse et que tu seras très fière de toi. Je tiens également à remercier Loïs Naudin pour tous les échanges que nous avons eus, pour le temps passé à répondre à mes questions sur les équations différentielles ou encore les problèmes d'optimisation.

À Anaïs Chekroun, pour ta franchise et tout le *peps* que tu as apporté au laboratoire lors de ton passage. Toujours le sourire et soucieuse du bien être des autres, c'était un réel plaisir de partager les pauses café avec toi. Je te souhaite une bonne continuation !

À Anastasia Pacary, pour tous nos échanges et ta sincérité. Je suis certaine que tu feras une thèse extraordinaire, tu le mérites amplement. Je te souhaite le meilleur pour la suite et que tu t'épanouisses !

À Aurianne Hagimont, pour la joie de vivre que tu as apporté au laboratoire lors de ton passage. Je te souhaite une belle continuation !

À Chloé Brodeau, pour ta bonne humeur et ta douceur. Un plaisir de t'avoir eue comme voisine de bureau et d'avoir partagé quelques trajets à vélo ensemble. Je suis convaincue que tu réaliseras une magnifique thèse, je te souhaite le meilleur pour la suite !

À Clémence Tropis, madame Denisse, d'avoir su animer comme il se doit cette équipe de doctorants durant le *week-end* de RESTORE. Merci pour toute la joie que tu dégages. C'était un réel plaisir de faire ce bout de chemin de thèse avec toi.

À Clément Blot, pour ton écoute mais aussi pour l'animation dans l'*open space* tard le soir. Merci pour ton soutien. Je suis certaine que tu vas briller lors de ta soutenance de thèse mais aussi dans ta carrière !

À Elena Morin, de m'avoir fait découvrir le Zebrafish, sur lequel tu consacres tant de temps. Merci pour ta bonne humeur. C'était un réel plaisir de faire équipe avec toi lors du *week-end* RESTORE sous le thème du *Western* ! Je te souhaite le meilleur pour la suite !

À Garance Castino, pour ta gentillesse et ton soutien. C'est un plaisir de voir que tu as toujours le sourire, que tu es à l'écoute et si généreuse. Je suis convaincue que tu arriveras au bout de tes projets, tu es une combattante.

À Godefroy Jacquemin, pour ta bonne humeur. On a partagé qu'un petit bout de chemin mais malgré ça je te remercie pour tes conseils et nos échanges scientifiques. Au-delà de la science, je n'oublie pas l'équipe d'or que l'on a formé avec une impressionnante prestation de karaoké. Merci pour ces moments ! Je te souhaite une belle réussite.

À Jean Nakhle, pour ta gentillesse et ton calme. Je serai toujours fascinée par ta vision de la science, tu es un scientifique inspirant. En plus de tes nombreuses qualités tu es également un sacré danseur ! Je te souhaite une bonne continuation.

À Laurène Mazeyrie, pour la joie de vivre que tu mets dans l'*open space*. Première rencontre à l'I2MC lorsqu'on était que stagiaire, c'était un réel plaisir de pouvoir recroiser ton chemin cette fois-ci à RESTORE. Je suis certaine que tu réussiras et que tu seras fière de toi ! J'en profite pour remercier Maxime Mathieu. Avec ton Nature en poche, tu as un début de carrière déjà bien écrit. Je suis convaincue de ta réussite !

À Marie Catenacci, ou KT, pour l'énergie débordante que tu dégages ! Je te remercie d'avoir été à mon écoute dans les bons moments et les moins bons. Toujours d'un grand sourire et d'une franchise. Je te souhaite de vivre une belle aventure enrichissante au Canada !

À Marie Salon, pour toute la douceur que tu apportes. Merci pour le soutien que tu m'as apporté. Je retiens ton brin de folie surtout durant le *week-end* de RESTORE ! Je te souhaite le meilleur pour la suite et notamment pour ta nouvelle vie de famille.

À Marion Stephan, pour toute ta bonne humeur. Je ne t'ai pas souvent croisée au laboratoire mais ça a été suffisant pour qu'un lien se crée. Merci pour ton soutien durant la dernière ligne droite mais aussi pour tous les moments partagés en dehors du laboratoire (hâte d'en partager de nouveaux !). Je te souhaite le meilleur pour la suite !

À Mélanie Escudero, pour ton écoute. Tu es une personne discrète mais sur qui on peut sans hésiter compter. Je suis certaine que tu feras une excellente thèse ! Je te souhaite le meilleur pour la suite de tes aventures.

À Rémi Montané, pour avoir été mon collègue de bureau. C'était un réel plaisir de te montrer les lignes de code et les cinétiques que je faisais mais surtout de faire la secrétaire pour les commandes du midi à Cantine & Gamelle. Un vrai binôme de bêtises, aussi bien dans le laboratoire qu'en dehors lors des *week-end* ! Merci pour ta bonne humeur et ton soutien. Prend soin de Mr. Patate surtout. Je suis certaine que tu feras une merveilleuse thèse !

À Silveric, pour ta joie de vivre durant la première année, toujours prêt à raconter des blagues ! Je te souhaite une bonne continuation.

À Miguel Thomas et Margaux Labrosse, merci aux deux réunionnais. Encore toutes mes félicitations pour la bourse CARE. Je suis certaine que vous ferez une excellente thèse. PS : un réel plaisir d'avoir partagé des pas de danse avec vous. Ne lâchez pas le *dance floor* surtout ! Merci pour votre bonne humeur.

À Ali Sanouj, Mathilde Romano et Romain Gauthier les nouveaux FLAMES. Je vous souhaite le meilleur pour cette incroyable aventure qu'est la thèse.

Je tiens à remercier les anciens camarades qui m'ont chaleureusement accueillie à mon arrivée au STROMALab. Merci à Hélène Leménager pour ton accueil. Ton parcours est sans doute bien lancé, je te souhaite une bonne continuation. Je remercie Loïc Fiévet pour ta bonne humeur et tes nombreuses blagues. Je suis convaincue que tu auras une très belle carrière ! Merci à Lise Rabiller pour ta joie de vivre, ton énergie et ta bonne humeur. On ne s'est pas vu pendant longtemps, notamment avec le confinement... mais c'est sans hésiter ces traits là que je retiens de toi et ton sourire permanent. Je te souhaite une belle continuation. Je remercie également le Dr. Damien Lagarde d'avoir animé l'*open space* dans ma première année de thèse. Il y a bien une qualité que je dois souligner ce sont tes talents de pâtissier, merci de nous avoir régales ! Au plaisir de suivre de loin tes aventures au Canada. Merci pour ton écoute et tes conseils. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Enfin, je tiens à remercier ces personnes qui, en plus d'avoir été des camarades incroyables, sont devenus des amis sur qui j'ai pu compter sans hésiter tout au long de cette aventure. Merci :

À David Bernard, ou « R de la Night », je suis admirative par tes capacités à coder, tout et n'importe quoi, en si peu de temps mais surtout à n'importe quelle heure. Merci de m'avoir fait découvrir ton univers du code, que cela soit sur R ou Python. Tu as été un sacré professeur durant cette aventure ! Mille mercis d'avoir été présent et de m'avoir écoutée, notamment dans les moments compliqués qui font partie des défis de la thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite !

À Lucas Bourdens, merci d'avoir été là durant un long chemin. Ton passage a sans doute marqué beaucoup de personnes dans ce laboratoire grâce à ta grande générosité qui fait partie de tes qualités.

Merci également pour tous les bons moments partagés en dehors du laboratoire. J'espère que tu vis une aventure incroyable en Australie. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite !

À Kimberley Coulson, merci Kimy pour ta joie de vivre. Je suis vraiment contente d'avoir partagé un bout de chemin avec toi. Bien plus qu'une collègue, merci d'avoir été présente, merci pour ta confiance, ton honnêteté, ton sourire au quotidien et ton désir de vouloir tout faire pour que tout le monde dans ce laboratoire se sente bien. Merci pour tous les moments partagés, les pauses café mais aussi en dehors du laboratoire. Je te souhaite le meilleur Kimy et surtout que tu sois épanouie en Australie !

À Adèle Arlat, merci d'avoir fait partie de cette incroyable aventure. Nous avons commencé la thèse et l'écriture du manuscrit en même temps, et nous avons soutenu nos travaux à seulement trois jours d'écart. Même si nos sujets de thèse étaient complètement différents, nous avons quand même partagé un point commun, et pas des moindres, les macrophages ! Sacrés macrophages qui nous auront fait tourner la tête durant ces trois années... Merci d'avoir partagé les mêmes tracasseries à chaque étape de la thèse mais aussi les meilleurs moments. Tu as été d'un réel réconfort et d'un soutien indéniable. Merci pour ton incroyable bonne humeur, ton sourire au quotidien et ta gentillesse innée. Je te souhaite le meilleur pour la suite Adèle, tu le mérites amplement !

Je n'ai jamais fait de la cytométrie en flux et pourtant, c'est comme si j'étais devenue une professionnelle en restant avec vous. Un simple Merci n'est clairement pas suffisant pour exprimer toute ma gratitude. Cette aventure n'aurait clairement pas eu la même saveur si vous n'étiez pas présente. Merci pour ces moments *shopping* puis surtout merci pour cet incroyable voyage à Prague que nous avons partagé et qui restera gravé. Merci :

À Jessica Fontaine, pour ta folie et tes pensées farfelues à longueur de journée. Tu as été d'un grand soutien durant cette fin d'aventure. Merci de ton écoute et d'avoir été présente à chaque moment. Merci pour ta cuisine, le rougail saucisses était un vrai régal et un sacré réconfort ! Tu es une personne forte, je suis convaincue que tu réaliseras tes rêves et arriveras au bout de tes projets. Je te souhaite le meilleur et surtout que tu t'épanouisses dans ta future vie sur l'île de la Réunion avec tes futurs petits compagnons !

À Marie-Laure Renoud, je ne suis clairement pas la première ni la dernière à te remercier pour tout... tu sais déjà tout ce que je pense de toi mais je me dois tout de même de t'écrire ce Merci. Merci d'avoir la main sur le cœur, d'être présente pour chacun d'entre nous. Tu as été d'un soutien indescriptible durant cette aventure et cela du début jusqu'à l'ouverture du champagne. Merci pour ta confiance, ton écoute, ta joie de vivre et ta bonne humeur au quotidien. C'est certain, les « caféésés ? » vont me manquer... Je te remercie d'avoir été présente, d'avoir pris soin de moi en m'apportant des viennoiseries lors de l'écriture de la thèse... un réconfort savoureux ! Merci.

J'associe à mes remerciements mes amis de longue date qui, sans le savoir, ont contribué à surmonter les moments de stress et de pression vécus durant cette grande aventure. Merci à mes amis du Sud-Ouest, notamment Audrey, Émilie, Gautier et Mathieu pour votre soutien et cela depuis le lycée. Merci à mes amis des années universitaires. Je pense tout particulièrement à Marine, Cindy et Mélanie pour votre soutien sans faille de Bordeaux jusqu'à Toulouse. Merci du fond du cœur d'être là pour moi depuis les débuts, je sais que je pourrai toujours compter sur vous pour les années à venir !

Enfin, c'est sans oublier Justin que je souhaite remercier de m'avoir épaulée et soutenue au quotidien durant cette aventure. Merci de m'avoir encouragée et d'avoir été mon réconfort, surtout durant cette dernière ligne droite. J'ai hâte de poursuivre la suite de mes aventures avec toi !

Mes derniers remerciements vont pour ma famille. Ce voyage n'aurait pu aboutir sans mes parents, mon frère et ma sœur. Je tiens à vous remercier de votre soutien indéfectible et de votre confiance durant tout ce parcours académique. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui et de m'avoir amenée jusque-là. Merci de m'avoir aidée à saisir ces belles opportunités. Je remercie également mes oncles pour vos félicitations.

• • • • •

Table des matières

Table des matières	1
Abréviations	5
Table des illustrations	7
Table des tableaux	9
Préambule	10
Résumé grand public	12
Partie I. Introduction	13
Chapitre 1. Réparation tissulaire chez le mammifère	14
I. La réparation tissulaire, un mécanisme physiologique complexe	15
A. Quelques généralités.....	15
B. La dynamique du processus de réparation tissulaire	16
1. Hémostase	17
2. Inflammation	19
3. Migration et prolifération cellulaires.....	20
4. Remodelage et maturation tissulaires.....	21
II. Altération de la réparation tissulaire au cours du vieillissement	24
A. Définitions	24
B. Les marqueurs du vieillissement	25
C. Réparation tissulaire et vieillissement	26
Chapitre 2. Réponse inflammatoire	29
I. La réponse inflammatoire, un mécanisme complexe et coordonné.....	29
A. Généralités.....	29
1. Historique	29
2. Définition	29
B. Implication du système immunitaire dans la réponse inflammatoire	30
C. Dynamique de la réponse inflammatoire.....	31
1. Introduction	31
2. Phase inflammatoire.....	32
a. Initiation de la réponse inflammatoire	32
b. Dynamique de la phase inflammatoire.....	35
3. Phase résolutive.....	37

II. Les macrophages, des cellules centrales du processus inflammatoire au cours de la réparation tissulaire	42
A. Hétérogénéité des macrophages	43
1. Origine des macrophages	43
a. Les macrophages dérivés des monocytes.....	43
b. Les macrophages résidents.....	43
i. Origine des macrophages résidents	43
ii. Les différents types de macrophages résidents	44
2. Hétérogénéité fonctionnelle	50
B. Les macrophages au cours de la réponse inflammatoire	53
1. Dynamique des macrophages résidents et circulants	54
2. Rôle des populations de macrophages au cours de l'inflammation	55
3. Macrophages et vieillissement	57
Chapitre 3. Modélisation <i>in silico</i> en biologie	59
I. La modélisation <i>in silico</i> , un outil complémentaire pour l'étude de phénomène biologique complexe	60
A. La modélisation, quelques généralités.....	60
1. Définition de la modélisation	60
2. Pourquoi faire un modèle <i>in silico</i> ?.....	60
B. Les apports et les limites de la modélisation <i>in silico</i> en biologie	61
1. Apports des modèles <i>in silico</i> par rapport aux modèles <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	61
2. Limites des modèles <i>in silico</i>	63
C. Modélisation des systèmes biologiques.....	65
1. La modélisation <i>in silico</i> dirigée par les théories	65
2. Utilisation de la modélisation <i>in silico</i> en biologie	66
II. Les différentes approches de modélisation <i>in silico</i> utilisées en biologie	70
A. Classification des approches	70
B. Approches de modélisation <i>in silico</i>	72
1. Modèles basés sur des règles.....	73
2. Modèles basés sur des équations	78
a. Réseaux booléens.....	78
b. Réseaux de Petri.....	81
c. Les réseaux bayésiens	85
d. Equations différentielles	87
C. Quelques exemples de modèles mathématiques de la réponse inflammatoire	91

1. Modèle de Day et ses collaborateurs (2006)	91
2. Modèle de Cooper et ses collaborateurs (2015)	93
3. Modèle de Torres et ses collaborateurs (2019)	94
Chapitre 4. Principes de calibration de modèle.....	98
A. Généralités.....	98
1. Calibration d'un modèle <i>in silico</i>	98
2. Étapes de calibration d'un modèle	99
B. Algorithmes d'optimisation.....	100
1. Principes généraux	100
2. Algorithmes d'optimisation.....	102
a. Algorithme d'optimisation locale	102
b. Algorithme d'optimisation globale	104
Problématique scientifique	107
Partie II. Travaux de thèse : mise au point d'un modèle mathématique de la réponse	
inflammatoire.....	108
Chapitre 1. Construction du modèle mathématique de la réponse inflammatoire.	111
I. Démarche pour le développement d'un modèle mathématique	111
II. Construction du modèle mathématique	112
A. Choix des variables et des interactions biologiques	112
1. Contexte biologique	112
2. Choix des variables	113
B. Description des équations différentielles.....	116
1. Système d'équations différentielles couplées	116
a. Signal de danger : $D(t)$	118
b. Macrophages résidents : $MR1(t)$	118
c. Macrophages dérivés des monocytes : $MC1(t)$	119
d. Macrophages résolutifs : $M2(t)$	119
2. Analyse du modèle	120
a. Paramètres du modèle	120
b. Solutions du modèle.....	122
3. Conditions initiales du modèle	123
Chapitre 2. Estimation des paramètres.....	124
I. Méthodologie de calibration.....	124
A. Données biologiques issues d'un modèle de lésion	124

B. Méthodologies développées pour la vérification des équations différentielles ...	125
1. Données d'expertises.....	125
a. Variable $D(t)$	125
b. Variables $MR1(t)$ et $MC1(t)$	125
c. Variable $M2(t)$	126
2. Stratégie de calibration sur les équations différentielles couplées	126
3. Résultats de simulations	128
a. Calibration CMA-ES sur les données biologiques.....	128
b. Calibration CMA-ES sur les données d'expertise	129
i. Calibration sur modèle entier.....	129
ii. Calibration sur une seule équation.....	133
4. Conclusions	133
C. Méthodologie de calibration avec des données limitées	134
1. Description de la méthode de calibration	134
2. Test sur un modèle « <i>benchmark</i> ».....	134
a. Présentation du modèle	134
b. Méthodologie de calibration	135
i. Bornes des paramètres	136
ii. Ajout de connaissances qualitatives à la fonction de coût	137
c. Résultats	140
3. Conclusions	142
Chapitre 3. Analyse du modèle.	143
I. Calibration du modèle de la réponse inflammatoire.....	143
1. Méthodologie de calibration.....	143
2. Résultats d'estimation des paramètres	144
3. Conclusions	147
II. Analyse du modèle	147
1. Analyse de sensibilité du modèle	147
2. Conclusions	149
Partie III. Discussion et perspectives	150
Références bibliographiques.....	154
Annexes.....	180

Abréviations

AN	Neutrophiles Apoptotiques
ATP	<i>Adenosine Tri-Phosphate</i>
CCL	<i>Chemokine Ligand</i>
CD	Cluster de Differentiation
CMA-ES	<i>Covariance Matrix Adaptation Evolution Strategy</i>
CXCL	<i>Chemokine with C-X-C motif Ligand</i>
D	Endommagement tissulaire
DAMP	<i>Dammage Associated Molecular Pattern</i>
FcR	<i>Fc receptor</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GA	<i>Genetic Algorithm</i>
HBP	<i>Heparin-Binding Protein</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
IFN	Interféron
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukine
LHS	<i>Latin Hypercube Sampling</i>
LL-37	<i>Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptide</i>
LPS	Lipopolysaccharides
MARCO	<i>Macrophage Receptor with Collagenous Structure</i>
MAE	<i>Mean Absolute Error</i>
MC1	Macrophages dérivés des Monocytes Circulants Inflammatoires
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MMP	Métalloprotéinase Matricielle
MPO	Myeloperoxidase

MR1	Macrophages Résidents Inflammatoires
MSC	<i>Mesenchymal Stromal Cell</i>
MSE	<i>Mean Squared Error</i>
N	Neutrophiles
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>NOD-Like Receptor</i>
NLRP	<i>NLR Family Pyrin Domain Containing</i>
NSGA-II	<i>Non-dominated Sorting Genetic Algorithm II</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OAT	<i>One At a Time</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PGE2	Prostaglandine E ₂
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
S.I.R.	Susceptibles, Infectés, Rétablis
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SPM	<i>Specialized Pro-Resolving Mediators</i>
TAM	<i>Tumor Associated Macrophage</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIM	<i>T-cell Membrane Protein</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Table des illustrations

Figure 1. La dynamique des phases de la réparation tissulaire.	17
Figure 2. Schéma résumant les étapes du processus d'hémostase.	19
Figure 3. Illustration de synthèse du processus de réparation tissulaire.	22
Figure 4. Importance des phases de la réparation tissulaire dans différents contextes.	23
Figure 5. Description du vieillissement en bonne santé et pathologique.	24
Figure 6. Les neuf marqueurs du vieillissement.	25
Figure 7. Processus cellulaires impactés avec l'âge.	27
Figure 8. Illustration des caractéristiques impactées au cours du vieillissement.	28
Figure 9. Représentation simplifiée de la voie de signalisation de l'inflammation.	30
Figure 10. Activation de la réponse inflammatoire.	35
Figure 11. Dynamique de la réponse inflammatoire.	40
Figure 12. Nombre de publications scientifiques sur le macrophage.	42
Figure 13. Pourcentage de publications scientifiques sur l'étude des macrophages résidents.	44
Figure 14. Diversité fonctionnelle des macrophages résidents.	45
Figure 15. Plasticité des macrophages résidents.	50
Figure 16. Illustration des propriétés fonctionnelles des macrophages M1 et M2.	51
Figure 17. Dynamique des macrophages M1 et M2.	52
Figure 18. Population des macrophages résidents au cours de la réponse inflammatoire.	55
Figure 19. Apparition de l'inflammation chronique au cours du vieillissement.	58
Figure 20. Comparaison des différentes approches de modélisation en biologie.	64
Figure 21. Proposition d'une classification des approches de modélisation dans le domaine du traitement de la donnée.	65
Figure 22. Nombre de publications scientifiques utilisant les approches de modélisation in silico de 1990 à 2022.	67
Figure 23. Analyse bibliométrique sur le thème de la modélisation in silico.	69
Figure 24. Classification des différentes approches de modélisation in silico, en fonction de l'échelle biologique et des caractéristiques des modèles (données sur l'année 2016).	72
Figure 25. Répartition graphique du nombre de publications entre 1990 et 2022 pour les principales techniques de modélisation utilisées en biologie.	73

Figure 26. Représentation schématique de la définition d'un agent.	74
Figure 27. Représentation schématique des différentes approches in silico	76
Figure 28. Représentation schématique d'un réseau booléen.	79
Figure 29. Exemple de réseau de Petri.	82
Figure 30. Représentation schématique d'un réseau bayésien.	86
Figure 31. Représentation schématique du modèle de Day et ses collaborateurs (2006).	92
Figure 32. Représentation schématique du modèle de Cooper et ses collaborateurs (2015). .	93
Figure 33. Représentation schématique du modèle de Torres et ses collaborateurs (2019)...	95
Figure 34. Schéma conceptuel des différentes étapes de calibration.	99
Figure 35. Illustration des solutions de deux fonctions objectives.....	101
Figure 36. Illustration du principe de descente de gradient.	103
Figure 37. Principe général des algorithmes évolutionnaires et génétiques.....	106
Figure 38. Représentation schématique de la démarche de construction d'un modèle mathématique.	111
Figure 39. Représentation conceptuelle du modèle in silico de la réponse inflammatoire à neuf variables.	113
Figure 40. Représentation conceptuelle du modèle développé in silico de la réponse inflammatoire.	115
Figure 41. Représentation schématique du modèle proposé de la réponse inflammatoire. ..	117
Figure 42. Données d'expertise.	126
Figure 43. Optimisation de notre modèle avec l'algorithme mono-objectif CMA-ES sur les données biologiques.	129
Figure 44. Calibration d'un modèle intermédiaire utilisant les données d'expertises.	130
Figure 45. Optimisation de notre modèle avec l'algorithme mono-objectif CMA-ES sur les données d'expertise.....	131
Figure 46. Dynamiques du modèle de benchmark (Oliveira et al., 2021).	135
Figure 47. Illustration du Front de Pareto.	138
Figure 48. Front de Pareto sur l'optimisation du modèle de benchmark.	141
Figure 49. Optimisation du modèle de benchmark avec l'algorithme NSGA-II.	142
Figure 50. Optimisation de notre modèle avec l'algorithme multi-objectifs NSGA-II sur les données biologiques.	144
Figure 51. Dynamique de la variable D après variation des paramètres r_2 et r_1	149

Table des tableaux

Tableau 1. Sommaire des variables utilisées dans le modèle.....	120
Tableau 2. Sommaire des paramètres utilisés dans le modèle.	121
Tableau 3. Conditions initiales du modèle.....	123
Tableau 4. Valeurs des paramètres estimées de notre modèle avec l’algorithme CMA-ES. 132	
Tableau 5. Valeurs estimées des paramètres du modèle benchmark.....	137
Tableau 6. Valeurs des paramètres estimées de notre modèle avec l’algorithme NSGA-II. 146	

Préambule

La capacité de réparation des tissus à la suite d'une lésion est essentielle à la survie de tous les organismes. En effet, tout organisme tend à conserver un état d'équilibre, autrement dit d'homéostasie. Ainsi, à la suite d'une lésion tissulaire, un mécanisme de réparation est initié instantanément qui aboutit, chez le mammifère, à la formation d'un tissu cicatriciel fibreux. La réparation tissulaire résulte d'un ensemble de mécanismes cellulaires complexes et coordonnés dans le temps qui répondent à des propriétés spatio-temporelles particulières.

La réponse inflammatoire est la première phase initiée à la suite d'un événement lésionnel. Son principal objectif est le retour à l'état d'homéostasie en amorçant le processus de réparation tissulaire. Cette étape fait intervenir les cellules du système immunitaire qui débarrassent le site lésé des agents infectieux et/ou des débris cellulaires qui s'y trouvent. Cette réponse inflammatoire se compose de deux phases. La première correspond à la phase inflammatoire aiguë au cours de laquelle les cellules de l'immunité sont recrutées et acquièrent des propriétés pro-inflammatoires. Cela se traduit, en partie, par une production de signaux inflammatoires qui entretiennent l'inflammation. Il s'ensuit une étape de résolution de l'inflammation qui se caractérise par une diminution de l'activité et du nombre des cellules de l'immunité. Cette résolution s'accompagne également d'un changement de propriétés de ces cellules qui deviennent anti-inflammatoires, autrement dit pro-résolutives.

Le changement de propriétés phénotypiques et fonctionnelles des cellules immunitaires est crucial pour résoudre l'inflammation et ainsi permettre une cicatrisation du tissu. En effet, une mauvaise résolution de l'inflammation a pour conséquence une persistance de l'inflammation, on parle alors d'inflammation chronique. Dans ces conditions, l'efficacité de la réparation tissulaire est diminuée ce qui conduit à un dysfonctionnement tissulaire. C'est notamment le cas dans le contexte physiologique du vieillissement. Cette résolution moins efficace participe à l'accumulation de microlésions dans les tissus qui peut conduire à une perte de fonction progressive, voire à une dépendance de la personne âgée. Il est clairement admis dans la littérature que cette phase inflammatoire constitue une étape clé du processus de réparation tissulaire dont elle conditionne l'issue.

Les avancées scientifiques sur la compréhension des mécanismes de résolution de l'inflammation dans un contexte de réparation tissulaire ont permis de mettre en exergue le rôle clé des macrophages. Cette population immunitaire est cependant hétérogène, notamment en termes d'origine tissulaire. En effet, les macrophages présents dans le tissu lésé proviennent de deux origines distinctes. Ils peuvent être issus de la différenciation des monocytes circulants, ou être issus des macrophages résidants dans le tissu. Ces deux populations de macrophages ont des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques distinctes ce qui suggère des rôles différents au cours de la résolution de l'inflammation. Plus précisément, il est montré dans la littérature que les macrophages résidents sont capables d'éliminer plus efficacement les neutrophiles (efférocytose) que les macrophages dérivés des monocytes circulants lors de la réponse inflammatoire. Cependant, leur contribution respective dans le processus de réparation tissulaire peut être difficile à évaluer *in vivo* pour des raisons technologiques et éventuellement de coût. Dans ce contexte, le développement d'un modèle *in silico* permettrait d'explorer et de tester des hypothèses sur le rôle distinct de ces deux populations de macrophages.

Dans ce projet de thèse nous avons choisi d'élaborer un modèle dynamique basé sur les équations différentielles, à partir des connaissances *a priori* et de données biologiques limitées. Cette approche permet de décrire l'évolution au cours du temps des différentes populations cellulaires au cours de la réponse inflammatoire. La modélisation mathématique offre une manière rigoureuse d'encapsuler les connaissances, à la fois théoriques et issues des données biologiques, sur le processus biologique à étudier.

L'objectif de ce modèle est d'améliorer les connaissances et d'explorer l'implication de ces deux populations de macrophages au cours de la résolution de l'inflammation à la suite d'une lésion tissulaire. Les paramètres impactés au cours du vieillissement et qui orientent la réponse inflammatoire vers l'apparition d'une inflammation chronique pourront également être évalués.

Résumé grand public

Au cours de ces dernières années, les approches de modélisation *in silico* en biologie ont été de plus en plus utilisées et commencent à être reconnues comme utiles et complémentaires à l'étude de phénomènes biologiques complexes. Dans le cadre de ce projet, l'utilisation de modèles *in silico* constitue une approche de choix pour améliorer la compréhension actuelle de la résolution de la réponse inflammatoire dans un contexte de réparation tissulaire chez le mammifère adulte.

La réaction inflammatoire est le premier mécanisme physiologique initié à la suite d'une lésion tissulaire. Cette réponse complexe est composée d'une phase inflammatoire aiguë, orchestrée par une activité et un recrutement important des cellules du système immunitaire. Elle est suivie d'une phase de résolution de l'inflammation durant laquelle l'activité ainsi que le nombre de cellules du système immunitaire sont diminués. La phase de résolution de l'inflammation permet d'orienter le processus de réparation vers une réparation tissulaire efficace, aboutissant à la formation d'une cicatrice. Une mauvaise résolution de l'inflammation conduit à l'apparition d'inflammation chronique et *in fine* à une dégradation progressive et irréversible de la fonctionnalité des organes. C'est notamment le cas au cours du vieillissement.

L'objectif de ce projet est d'améliorer la connaissance du processus biologique de la réparation tissulaire chez le mammifère adulte, en se focalisant sur la réponse inflammatoire. Pour ce faire, nous avons développé un modèle basé sur le principe des systèmes dynamiques, à base d'équations différentielles. Ce modèle mathématique permet de décrire l'évolution des populations cellulaires de cette réponse inflammatoire au cours du temps, et plus particulièrement des macrophages. En effet, il est communément admis dans la littérature scientifique que le macrophage, une des cellules clé du système immunitaire, joue un rôle fondamental dans la résolution de la réponse inflammatoire.

A terme, comprendre et identifier les acteurs clés de la réponse inflammatoire permettrait d'agir sur ces cibles pour favoriser une bonne réparation. Cette stratégie constitue un intérêt majeur, notamment pour comprendre les paramètres impactés au cours du vieillissement.

Partie I. Introduction

Chapitre 1. Réparation tissulaire chez le mammifère

L'intérêt porté aux mécanismes de réparation tissulaire ne date pas de ces dernières décennies. En effet, le soin des plaies est pratiqué depuis l'antiquité. Hippocrate (400 ans avant J.C.) explique l'importance de drainer les plaies (Broughton *et al.*, 2006). Galien (130 à 200 ans après J.C.) décrit le principe de la cicatrisation et propose des gestes de premiers secours pour traiter les plaies. En 1883, Elie Metchnikoff décrit des cellules capables de capturer et de digérer des débris, un rôle crucial de défense de l'organisme face aux pathogènes. Dans les années 1950, la découverte des différents médiateurs chimiques sécrétés au cours d'une blessure permet d'amorcer les recherches sur le mécanisme cellulaire et moléculaire de réparation tissulaire. Cependant, ce processus de réparation tissulaire est complexe et il reste encore aujourd'hui de nombreux verrous dans la compréhension de ce mécanisme.

I. La réparation tissulaire, un mécanisme physiologique complexe

A. Quelques généralités

La réparation tissulaire fait partie des mécanismes physiologiques essentiels à la survie de tous les organismes vivants. D'une façon générale, un événement lésionnel induit une rupture de l'état d'homéostasie. Cette notion d'homéostasie est définie, par le physiologiste Claude Bernard en 1865, comme étant la capacité que peut avoir un système quelconque à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures (Bernard *et al.*, 1865). Ainsi, dans ce contexte où l'équilibre tissulaire est rompu, les mécanismes de réparation tissulaire sont alors immédiatement initiés permettant de former une cicatrice.

Quels que soient le type de la lésion et son intensité, tout organisme est capable de mettre en place un mécanisme de réparation remarquable. Chez les invertébrés et les vertébrés non mammaliens, cette réparation tissulaire conduit à une régénération tissulaire. Cette dernière permet la récupération de la morphologie et de la fonctionnalité tissulaires initiales (Brookes and Kumar, 2008; Bely and Nyberg, 2010). En revanche, chez le mammifère adulte, ce mécanisme de réparation tissulaire aboutit à la formation d'une cicatrice caractérisée par l'apparition d'un tissu conjonctif fibreux.

La cicatrisation est une réponse physiologique rapide. Elle permet, notamment dans les cas d'agressions cutanées, de créer une barrière face aux pathogènes et d'éviter une hémorragie. Ainsi, ce tissu de remplacement permet de récupérer rapidement une stabilité architecturale et un retour à l'équilibre. Cependant, à l'issue de cette cicatrisation, et dans la plupart des cas, le tissu ne récupère ni sa morphologie initiale, ni sa fonction.

Au cours du vieillissement, la réparation tissulaire peut conduire progressivement à une fibrose tissulaire. Cette dernière correspond à une production exacerbée de tissu cicatriciel participant à la perte de fonctionnalité de l'organe (Eming *et al.*, 2014; Biernacka and Frangogiannis, 2011; Harvey *et al.*, 2016).

En résumé, ce mécanisme essentiel de survie, retrouvé chez les mammifères, a pour principal objectif le regain de l'équilibre tissulaire. C'est un mécanisme rapide, mais qui ne permet pas de récupérer une fonctionnalité complète du tissu.

B. La dynamique du processus de réparation tissulaire

La réparation tissulaire est un processus complexe qui fait intervenir une succession de phases répondant à des propriétés spatio-temporelles bien particulières (Clark and Henson, 1988; Gurtner *et al.*, 2008; Wilkinson and Hardman, 2020). A la suite d'une lésion tissulaire, l'organe lésé réagit naturellement en induisant le recrutement et l'activation de plusieurs acteurs cellulaires comme les cellules du système immunitaire, les cellules mésenchymateuses ou encore endothéliales. En parallèle, on observe la libération de nombreux médiateurs (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) ainsi que des modifications de la matrice extracellulaire, afin d'induire une cicatrisation rapide. Ce dialogue complexe et coordonné entre les cellules et leur micro-environnement (molécules sécrétées et matrice extracellulaire) durant la réparation tissulaire est désigné par le terme de « réciprocity dynamique » (Schultz *et al.*, 2011). Les réponses biochimiques, biophysiques et cellulaires induites par cette réciprocity dynamique jouent un rôle central dans la réparation tissulaire.

Classiquement, on peut décrire cette réparation tissulaire en quatre étapes distinctes qui se chevauchent dans le temps (Figure 1) :

- 1) La phase d'**hémostase**. Les mécanismes physiologiques de l'hémostase sont enclenchés lorsque l'évènement lésionnel induit une brèche vasculaire. Un rôle clé de cette étape est l'arrêt du saignement.
- 2) La **réaction inflammatoire** qui est en réalité concomitante à la première phase. Il est d'ailleurs courant de regrouper ces deux étapes en une seule (Gurtner *et al.*, 2008). Cette réaction inflammatoire correspond au recrutement des cellules du système immunitaire, les leucocytes (ou globules blancs) qui ont notamment un rôle de « nettoyage » du site lésé.
- 3) La phase de **migration** et de **prolifération cellulaires**. Cette étape permet d'amorcer la reconstitution du tissu lésé en recrutant de nouvelles cellules qui vont notamment participer à la formation de la cicatrice.
- 4) La phase de **remodelage** tissulaire. Cette dernière démarre 2 à 3 semaines après l'évènement et peut durer plusieurs mois, voire années en fonction de l'origine et de l'intensité de la lésion. Ce remodelage permet une réorganisation et une maturation du tissu fibreux.

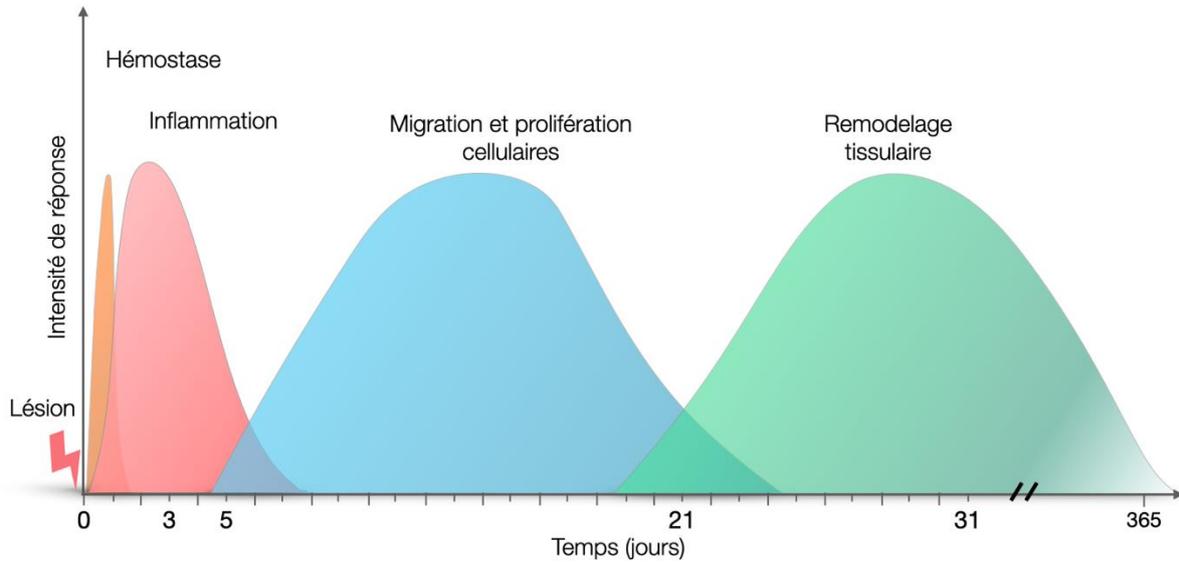


Figure 1. La dynamique des phases de la réparation tissulaire.

Le processus de réparation tissulaire met en place quatre phases successives qui se chevauchent dans le temps : 1) la phase d'hémostase ; 2) la phase inflammatoire ; 3) la phase de migration et de prolifération cellulaires ; 4) la phase de remodelage tissulaire. Ces phases sont primordiales à la mise en place d'un tissu cicatriciel. En fonction du type de lésion et de son intensité, la durée du remodelage tissulaire peut varier. L'illustration est inspirée de Seifert et ses collaborateurs (2012), « Skin regeneration in adult Axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates », *PLoS ONE*.

1. Hémostase

A la suite de l'évènement lésionnel provoquant une brèche vasculaire, le sous-endothélium vasculaire se retrouve exposé à la circulation sanguine déclenchant le processus de réparation tissulaire. L'hémostase a pour objectif l'arrêt de l'hémorragie par formation d'un caillot de fibrine permettant la restauration provisoire de l'intégrité de la barrière endothéliale. La formation de ce caillot sanguin permet de créer une barrière qui empêche l'exposition directe de l'organisme à un environnement extérieur potentiellement hostile, de par la présence de pathogènes pouvant infecter la zone lésée. Les mécanismes hémostatiques sont relativement conservés et sont classiquement décrits en trois étapes : l'hémostase primaire, secondaire et la fibrinolyse (Gale, 2011; Versteeg *et al.*, 2013).

- **Hémostase primaire** : cette étape est marquée par une vasoconstriction du vaisseau sanguin. La réduction du flux sanguin local favorise l'interaction des plaquettes, acteur clé de l'hémostase, avec l'endothélium vasculaire. Cette interaction active les plaquettes qui s'agrègent entre elles au niveau de la brèche vasculaire (Varga-Szabo *et al.*, 2008). On parle

alors d'agrégation plaquettaire qui permet la formation du clou plaquettaire, ou thrombus blanc. Les plaquettes activées libèrent un grand nombre de médiateurs inflammatoires participant, entre autres, au recrutement des cellules immunitaires (Ali *et al.*, 2015).

- **Hémostase secondaire** : l'agrégation des plaquettes initie la cascade moléculaire impliquée dans la coagulation. Cette activation enzymatique permet la production de la thrombine, une enzyme centrale de la cascade de coagulation (Crawley *et al.*, 2007). La thrombine est une sérine protéase qui a pour fonction le clivage du fibrinogène soluble, une protéine présente dans la circulation sanguine. Ce clivage permet de générer par polymérisation un maillage de fibrine insoluble permettant de stabiliser la formation du caillot sanguin (Falati *et al.*, 2002). Cette matrice de fibrine a un rôle crucial. Outre l'arrêt du saignement, elle favorise l'infiltration et régule l'activité des cellules du système immunitaire (Flick *et al.*, 2004; Laurens *et al.*, 2006). Ce caillot sanguin sert également de matrice prévisionnelle pour la formation de la cicatrice (Becker *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2004; Standeven *et al.*, 2005). Dans des cas pathologiques, comme par exemple les plaies diabétiques, il est montré que cette matrice prévisionnelle présente une porosité augmentée (Jörneskog *et al.*, 1996).
- **Fibrinolyse** : la dernière phase de l'hémostase correspond à la fibrinolyse qui désigne le processus physiologique permettant la dégradation de la fibrine et donc du thrombus (Chapin and Hajjar, 2015). En effet, la présence du caillot sanguin formé dans les premières phases se doit d'être transitoire pour permettre une reconstitution de l'endothélium. L'enzyme clé de ce processus est la plasmine, issue de la conversion du plasminogène, une protéine présente dans la circulation sanguine. La plasmine possède une activité protéolytique permettant de dégrader la fibrine et ainsi d'éviter l'apparition de thrombose (Opneja *et al.*, 2019).

L'étape d'hémostase permet l'arrêt du saignement par formation d'un caillot sanguin (Figure 2). Elle permet d'initier la réparation tissulaire en participant au recrutement et à l'activation des cellules du système immunitaire (Carestia *et al.*, 2019; Gros *et al.*, 2015; Semple *et al.*, 2011), par la création d'une matrice prévisionnelle cicatricielle. L'interaction étroite entre les plaquettes et les cellules impliquées dans la phase inflammatoire est primordiale et permet de poursuivre ce processus de réparation tissulaire vers la formation de la cicatrice.

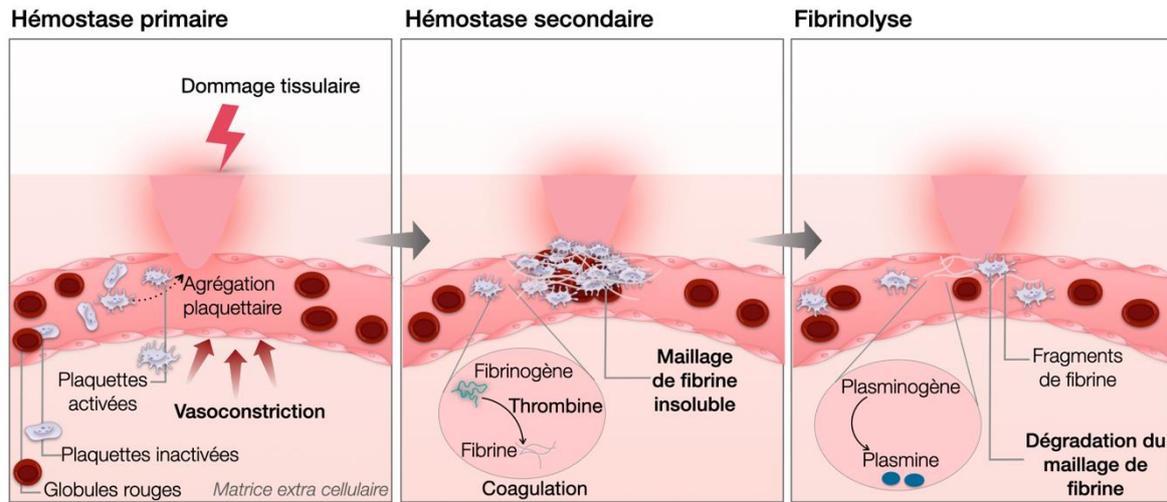


Figure 2. Schéma résumant les étapes du processus d'hémostase.

La phase d'hémostase est une étape qui démarre rapidement après un événement lésionnel. Elle est subdivisée en trois étapes principales : 1) l'hémostase primaire : une étape marquée par une vasoconstriction du vaisseau sanguin et une activation des plaquettes qui s'agrègent au niveau du site lésionnel ; 2) l'hémostase secondaire : la thrombine, enzyme clé de cette étape, permet la production de fibrine à l'origine de la formation du maillage de fibrine (ou caillot de fibrine) ; 3) la fibrinolyse : cette dernière étape permet la dégradation du maillage de fibrine grâce à l'action de la plasmine.

2. Inflammation

La réponse inflammatoire est le premier mécanisme initié à la suite d'une lésion tissulaire si celle-ci n'engendre pas de brèche vasculaire. Dans le cas d'une lésion endommageant l'endothélium vasculaire, la réponse inflammatoire est initiée en parallèle à l'hémostase. Elle débute dans les heures suivant la lésion et dure 3 à 5 jours. C'est un mécanisme physiologique de défense face aux dommages cellulaires générés par la lésion et aux possibles pathogènes qui ont pu s'infiltrer par la brèche vasculaire. La réaction inflammatoire est un processus complexe, orchestré par plusieurs types cellulaires, du système immunitaire, aux propriétés fonctionnelles et temporelles spécifiques. Ces acteurs cellulaires seront plus amplement détaillés dans la partie I, chapitre 2 de ce manuscrit. Brièvement, l'inflammation est composée de deux phases : une phase inflammatoire aiguë suivie d'une phase de résolution.

- **Phase inflammatoire aiguë** : la phase inflammatoire aiguë est caractérisée par un recrutement rapide, sur le site lésé, des différentes cellules du système immunitaire inné. Ce recrutement est stimulé par plusieurs signaux inflammatoires libérés à la suite de l'agression tissulaire. Parmi ces signaux inflammatoires, on trouve des signaux de danger qui sont

produits par les cellules endommagées, les DAMPs (« *Damage Associated Molecular Patterns* »), ou par les pathogènes, les PAMPs (« *Pathogens Associated Molecular Patterns* »). Parmi les cellules clés de cette réponse inflammatoire on trouve les neutrophiles qui sont recrutés rapidement et de façon transitoire dans les temps précoces de la réaction inflammatoire (Kolaczowska and Kubes, 2013). En parallèle, les monocytes sont également recrutés et se différencient en macrophages en infiltrant les tissus. Les macrophages acquièrent une activité pro-inflammatoire qui favorise l'inflammation (Shi and Pamer, 2011). Les macrophages, tout comme les neutrophiles, sont capables d'effectuer la phagocytose. Ce processus permet d'internaliser des débris cellulaires, ou particules étrangères, afin de nettoyer le site lésé. Plusieurs molécules inflammatoires (cytokines, chimiokines...) sont libérées par ces cellules inflammatoires, induisant un environnement pro-inflammatoire et favorisant le recrutement et l'activité inflammatoire des cellules immunitaires.

– **Phase de résolution** : la phase de résolution de l'inflammation correspond notamment à l'arrêt du recrutement des neutrophiles. Cette phase est également marquée par un changement de profil des macrophages présents dans le tissu qui deviennent anti-inflammatoires et réparateurs. Globalement, cette phase de résolution est caractérisée par un passage d'un environnement pro-inflammatoire vers un environnement pro-résolutif.

La réaction inflammatoire est une étape initiale nécessaire pour débarrasser le site lésé des débris cellulaires et des pathogènes potentiels. La phase inflammatoire aiguë doit absolument être suivie d'une phase de résolution efficace, afin de limiter les dommages tissulaires. Cette phase de résolution est notamment permise par les macrophages qui libèrent de nombreux médiateurs de l'inflammation.

3. Migration et prolifération cellulaires

L'étape qui suit la réaction inflammatoire est une étape de migration, de prolifération et de différenciation cellulaires qui débute approximativement au 2^{ème} jour et dure jusqu'au 10^{ème} jour post-lésion (Gurtner *et al.*, 2008). En réalité, cette étape est amorcée en parallèle de la résolution de l'inflammation.

Le tissu lésé se trouve en condition d'hypoxie (diminution du taux d'oxygène) (Darby and Hewitson, 2016). La réduction de la disponibilité en oxygène favorise l'angiogenèse, un processus de formation de nouveaux capillaires sanguins, au sein du site lésé afin d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires à la néoformation du tissu. Les médiateurs pro-

angiogéniques, comme le VEGF (« *Vascular Endothelial Growth Factor* »), favorisent notamment cette angiogénèse (Galiano *et al.*, 2004). Cette étape permet la formation d'un tissu cicatriciel transitoire, nommé tissu de granulation, qui remplace la matrice de fibrine formée à l'étape d'hémostase. On parle de tissu de granulation en raison de son apparence granulaire due aux nombreux capillaires sanguins qui le constituent. Les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) ainsi que les fibroblastes et les myofibroblastes, participent au processus de réparation tissulaire notamment en se différenciant en différents types cellulaires et en synthétisant les différents constituants de la matrice extracellulaire (Desmoulière *et al.*, 2005; DiMarino *et al.*, 2013; Sagaradze *et al.*, 2020). Ces cellules prolifèrent et migrent vers le site lésé en réponse à la libération de diverses molécules chimioattractantes, telles que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF : « *Platelet Derived Growth Factor* »). Les macrophages jouent également un rôle clé dans cette étape en participant, entre autres, à l'angiogénèse, au recrutement cellulaire et à la régulation de la synthèse de la matrice extracellulaire (Novak and Koh, 2013b).

Cette étape amorce la reconstruction du tissu en mettant en place un tissu de granulation, riche en capillaires sanguins et en cellules prolifératives.

4. Remodelage et maturation tissulaires

La dernière phase de la réparation tissulaire correspond au remodelage du tissu qui débute autour du 21^{ème} jour après l'événement lésionnel et peut durer jusqu'à 1 an, et plus, en fonction de l'intensité de la lésion. En réalité, cette phase débute au cours de la phase de prolifération cellulaire. L'excès de matrice extracellulaire est dégradé par les métalloprotéinases matricielles (MMPs), produites, entre autres, par les macrophages. Cette dégradation de la matrice extracellulaire permet de favoriser l'infiltration des cellules prolifératives et donc le remodelage tissulaire. Cette phase est plus particulièrement caractérisée par une diminution de l'activité angiogénique et un ralentissement du flux sanguin et de l'activité métabolique. Ce remodelage aboutit à la formation d'un tissu fibreux, autrement dit cicatriciel, constitué de collagène et décrit comme avasculaire. Ce remodelage tissulaire signe la fin du processus de réparation tissulaire (Figure 3). Cependant, cette étape est longue et aboutit à un tissu cicatriciel ne permettant pas de récupérer la morphologie et la fonction initiales du tissu.

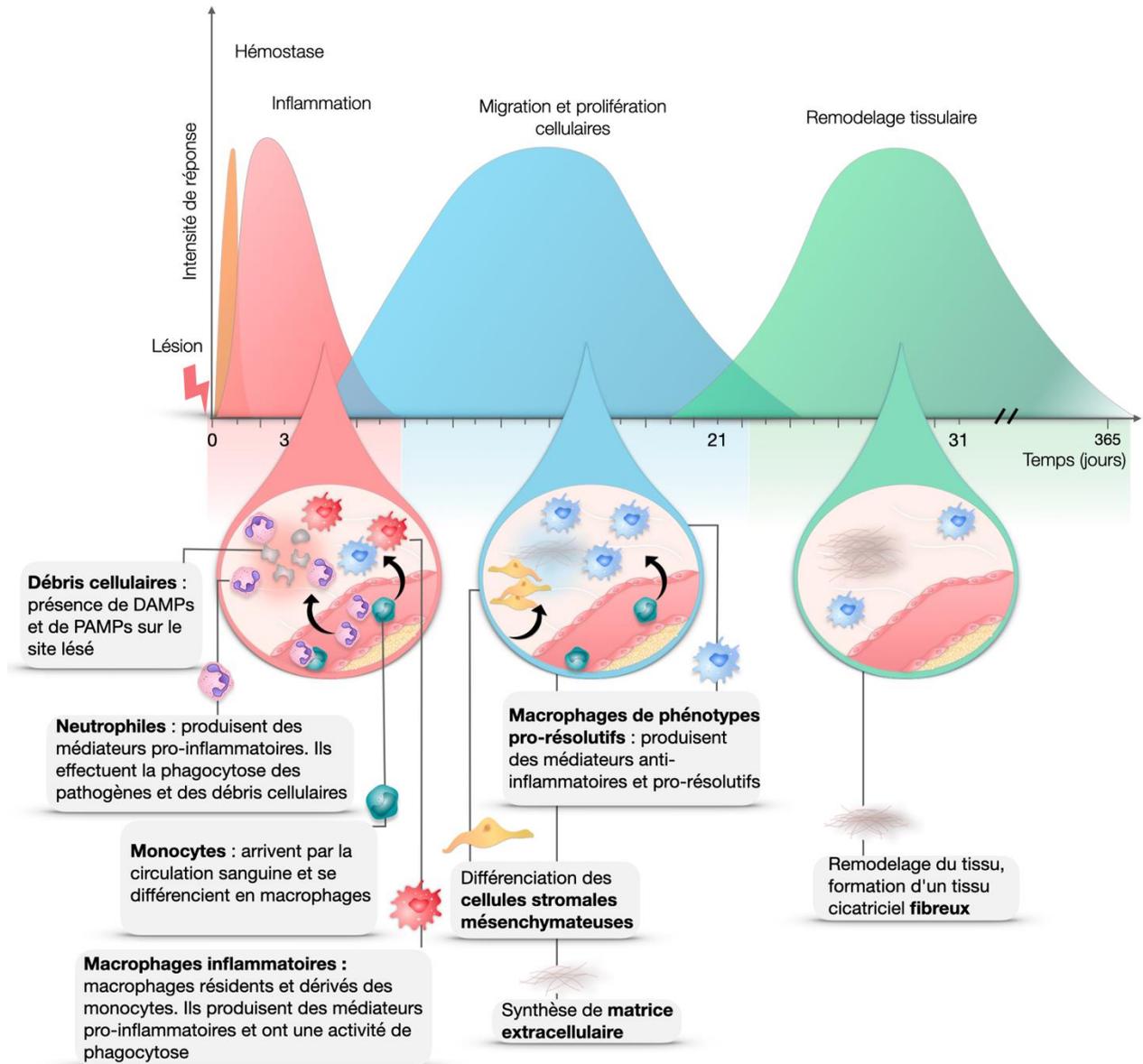


Figure 3. Illustration de synthèse du processus de réparation tissulaire.

Le mécanisme de réparation tissulaire débute, quelques minutes après une lésion, par une réponse inflammatoire. Celle-ci est orchestrée par les cellules du système immunitaire qui sont recrutées en grand nombre au niveau du site lésionnel. Parmi ces cellules, les neutrophiles et les macrophages libèrent, durant la phase inflammatoire aiguë, un grand nombre de médiateurs pro-inflammatoires. Cette phase aiguë est suivie par une phase de résolution, marquée par l'activité des macrophages résolutifs. En parallèle de cette résolution, l'étape de migration et de prolifération cellulaires (notamment celle des cellules stromales mésenchymateuses) est amorcée. A ce stade, on observe une production de matrice extracellulaire qui est ensuite remodelée au cours de la dernière phase de ce mécanisme correspondant au remodelage tissulaire.

Les étapes de la réparation tissulaire sont globalement les mêmes dans tous les tissus (Krafts, 2010). Chaque phase constitutive de ce processus est primordiale pour réparer efficacement le tissu lésé. La perturbation de l'une de ces phases entraîne une mauvaise réparation (Wilkinson and Hardman, 2020).

Il est clairement admis que les cellules du système immunitaire jouent un rôle clé dans le mécanisme de réparation tissulaire. Par exemple, une déplétion des macrophages entraîne un retard de la réparation tissulaire avec une diminution de la prolifération cellulaire, une diminution du dépôt de collagènes et le maintien d'un environnement inflammatoire (Lucas *et al.*, 2010; Mirza *et al.*, 2009). Dans le cas d'une lésion hépatique, la déplétion des macrophages réduit la formation de la matrice extracellulaire. Lorsque cette déplétion est effectuée à un temps plus tardif, lors de la résolution de l'inflammation, elle favorise un maintien de la fibrose hépatique (Duffield *et al.*, 2005; Ramachandran *et al.*, 2012). Dans un contexte inflammatoire induit par un agent pathogène dans le poumon, ou encore dans un granulome, la déplétion des neutrophiles diminue le recrutement des monocytes au niveau du dommage tissulaire (Janardhan, 2006; von Stebut *et al.*, 2003).

Ces cellules immunitaires jouent donc un rôle crucial, notamment dans l'initiation de la réparation tissulaire par la mise en place de la réponse inflammatoire. Lorsque la résolution de l'inflammation est inefficace, celle-ci persiste dans le temps et devient alors chronique. Elle peut être à l'origine de fibrose tissulaire ou encore de plaies chroniques comme les ulcères (Figure 4) (Zhao *et al.*, 2016; Laurent *et al.*, 2017; Eming *et al.*, 2014; Wynn and Ramalingam, 2012).

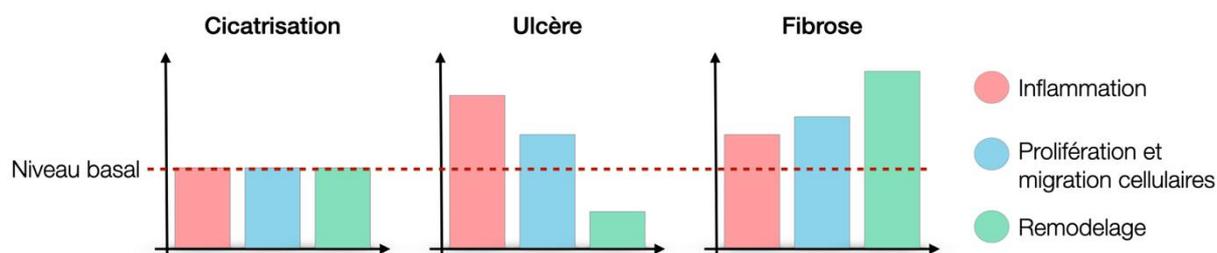


Figure 4. Importance des phases de la réparation tissulaire dans différents contextes.

Le processus de réparation physiologique conduit à la formation d'une cicatrice. Lorsque l'inflammation persiste dans le temps, le mécanisme de réparation tissulaire est alors impacté ce qui peut conduire à l'apparition d'ulcère ou de fibrose. Cette illustration est adaptée de Laurent, Paoline, et ses collaborateurs (2017), « Immune-mediated repair: a matter of plasticity », *Frontiers in Immunology*.

Outre les cas pathologiques, l'inflammation chronique est également retrouvée chez le sujet âgé et participe à l'apparition de fibrose. De plus, l'altération des mécanismes de réparation tissulaire avec l'âge contribue à l'apparition des maladies associées au vieillissement.

II. Altération de la réparation tissulaire au cours du vieillissement

A. Définitions

Le vieillissement est un processus physiologique continu, universel, qui prend place dès la naissance. D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), le vieillissement se définit comme « le produit de l'accumulation d'un vaste éventail de dommages moléculaires et cellulaires au fil du temps ; cette accumulation entraîne une dégradation progressive des capacités physiques et mentales, une majoration du risque de maladie et, enfin, le décès ». Cette dégénérescence est notamment associée à la notion de « fragilité » qui correspond à un mauvais retour à l'état d'homéostasie à la suite de l'exposition à des stress (Clegg *et al.*, 2013). L'exposition à des stress répétés conduit à une altération progressive de la fonctionnalité des tissus ce qui peut, *in fine*, participer à un déclin progressif de la personne âgée. Ce déclin correspond au point de bascule où le risque d'un vieillissement pathologique est accéléré (Bektas *et al.*, 2018) (Figure 5).

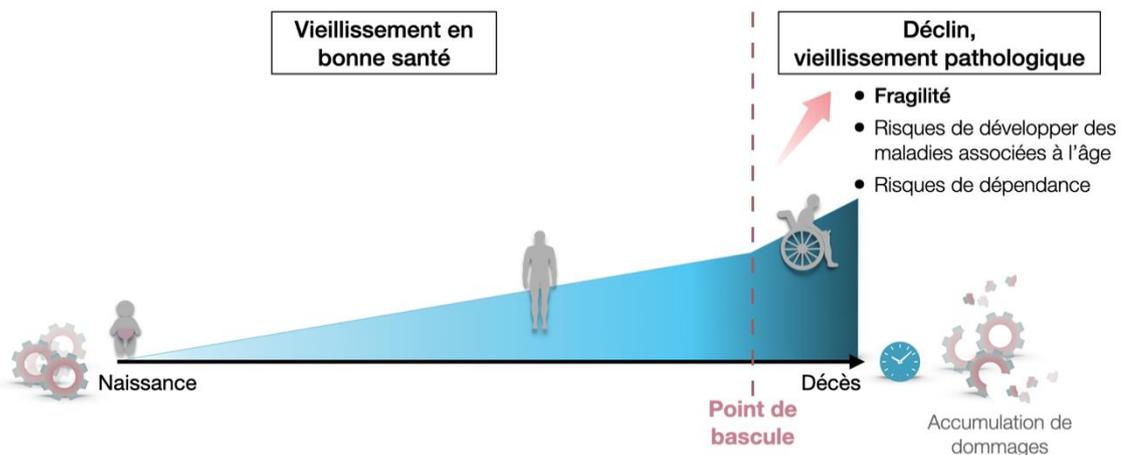


Figure 5. Description du vieillissement en bonne santé et pathologique.

Le vieillissement est un processus continu qui débute dès la naissance. Il se caractérise par une accumulation de dommages cellulaires tout au long de la vie. L'accumulation de stress répétés peut conduire à un point de bascule (idée conceptuelle) à partir duquel les risques de dépendance et de développement de maladies associées à l'âge sont augmentés.

B. Les marqueurs du vieillissement

Le vieillissement est marqué par de nombreux changements biologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire. Ces changements, à l'origine d'une accumulation de dommages cellulaires et moléculaires, sont provoqués à la fois par des facteurs génétiques programmés (senescence cellulaire) et des facteurs environnementaux susceptibles d'accélérer le processus (tabac, alimentation, alcool...) (Ferrucci *et al.*, 2020; López-Otín *et al.*, 2013). Durant ces dernières décennies de nombreux travaux ont été menés pour comprendre les mécanismes amenant à un vieillissement délétère. A ce jour, la communauté scientifique caractérise le vieillissement par différents marqueurs biologiques (Chakravarti *et al.*, 2021; Ferrucci *et al.*, 2020; Lemoine, 2021; McHugh and Gil, 2018; Li *et al.*, 2021; Campisi *et al.*, 2019). López-Otín et ses collaborateurs sont, en 2013, à l'origine de la proposition de ces marqueurs. A travers leur étude, ils synthétisent les différents travaux sur les mécanismes du vieillissement et proposent neuf marqueurs caractéristiques du vieillissement général chez les organismes vivants, particulièrement adaptés aux mammifères (Figure 6) (López-Otín *et al.*, 2013).



Figure 6. Les neuf marqueurs du vieillissement.

Le travail de López-Otín et ses collaborateurs met en avant neuf marqueurs caractéristiques du vieillissement, répartis en trois grandes catégories : caractéristiques primaires, antagonistes et intégratives. Cette illustration est adaptée de López-Otín et ses collaborateurs, (2013) « The hallmarks of aging », *Cell*.

Ces marqueurs du vieillissement ont été regroupés en 3 catégories : 1) les caractéristiques primaires qui regroupent des marqueurs associés à l'accumulation des dommages cellulaires au cours du temps ; 2) les caractéristiques antagonistes qui incluent les marqueurs liés aux conséquences des dommages cellulaires ; 3) les caractéristiques intégratives qui regroupent les marqueurs responsables du phénotype associé au vieillissement et notamment à l'altération de la fonctionnalité des tissus et des organes.

Récemment, cinq nouveaux marqueurs du vieillissement ont été proposés par Schmauck-Medina et ses collaborateurs (Schmauck-Medina *et al.*, 2022), parmi lesquels l'altération des propriétés mécaniques des tissus et l'inflammation, autrement nommée « *inflammaging* ». Cette dernière correspond à une inflammation stérile, dite de bas grade, et chronique retrouvée chez le sujet âgé. Elle est associée à une augmentation des signaux pro-inflammatoires dans l'organisme, accompagnée d'une réponse anti-inflammatoire diminuée. Ces signaux pro-inflammatoires sont notamment générés par des cellules altérées, endommagées, ou des débris cellulaires (Franceschi, Garagnani, Parini, *et al.*, 2018; Franceschi and Campisi, 2014).

C. Réparation tissulaire et vieillissement

Le vieillissement se caractérise donc par une accumulation de dommages entraînant une perte progressive de l'intégrité et de la fonctionnalité cellulaire et tissulaire. Un lien étroit a bien été établi entre le vieillissement et l'apparition des diverses maladies associées à l'âge, telles que la sarcopénie, le diabète, l'apparition de cancers ou encore des maladies neurodégénératives (Cooper *et al.*, 2015; Franceschi, Garagnani, Morsiani, *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2019; Jaul and Barron, 2017). Cette perte de l'intégrité tissulaire est ainsi associée à une diminution de l'efficacité du processus de réparation tissulaire qui ne permet plus avec l'âge, de maintenir un état d'équilibre (Yun, 2015; López-Otín *et al.*, 2013).

Globalement, tous les stades du processus de réparation tissulaire sont impactés au cours du vieillissement (Gosain and DiPietro, 2004). Par exemple, on observe une augmentation de l'agrégation plaquettaire durant la phase d'hémostase. La phase inflammatoire du sujet âgé est marquée notamment par une augmentation de la libération des médiateurs inflammatoires et une altération de la fonction des macrophages. La phase de prolifération est retardée et le remodelage tissulaire réduit (Figure 7) (Ding *et al.*, 2021; Kale and Yende, 2011; Le Blanc and Lordkipanidzé, 2019).

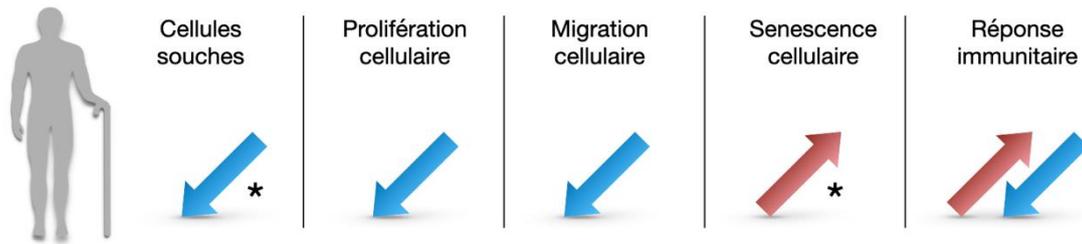


Figure 7. Processus cellulaires impactés avec l'âge.

Au cours du vieillissement, les capacités de réparation tissulaire sont altérées. Cela est notamment associé à une diminution de l'activité des cellules souches, de la prolifération et de la migration cellulaires. De plus, les cellules sénescents s'accumulent dans les tissus avec l'âge et l'activité immunitaire est également impactée. Cette illustration est adaptée de Ding et ses collaborateurs, (2021) « Regulation of the Wound Healing Response during Aging », *Journal of Investigate Dermatology*. Les auteurs précisent que le symbole « * » signifie un manque de données approfondies.

La diminution des capacités de réparation tissulaire augmente les risques d'apparition de fibrose dans les tissus. Le cœur est notamment un exemple d'organe impacté avec l'âge. Un dépôt progressif de collagène s'effectue dans le système cardiaque (vaisseaux, espace interstitiel et périvasculaire) conduisant à une réduction de la compliance artérielle associée à des dysfonctions diastoliques (Lakatta and Levy, 2003; Biernacka and Frangogiannis, 2011). Dans le poumon, un dépôt de matrice extracellulaire est également constaté avec l'âge, pouvant conduire à des cas pathologiques comme la fibrose pulmonaire idiopathique (Chanda *et al.*, 2019). L'effet de l'âge sur ces deux organes est caractérisé par une accumulation excessive de cellules sénescents et l'apparition de l'*inflammaging*. Ces deux facteurs seraient associés à une diminution des capacités de réparation tissulaire dans ces organes (Murtha *et al.*, 2019).

Une inflammation aiguë est bénéfique à l'organisme pour permettre la réparation tissulaire. Cependant, lorsqu'elle devient chronique, notamment au cours du vieillissement, elle empêche le retour à un état d'équilibre et à la récupération de l'intégrité architecturale tissulaire (Franceschi and Campisi, 2014). Elle contribue ainsi à l'apparition des maladies associées à l'âge et à la fragilité (Bektas *et al.*, 2018; Ferrucci and Fabbri, 2018; Rea *et al.*, 2018). Par conséquent, elle est définie comme un marqueur prédictif de la morbidité (Franceschi, Garagnani, Parini, *et al.*, 2018; Ferrucci and Fabbri, 2018). Des méthodes de « *deep-learning* » (apprentissage profond) se développent afin de cibler des marqueurs associés au système immunitaire et liés à l'apparition de cette inflammation chronique (Sayed *et al.*, 2021). Par ailleurs, le système immunitaire qui orchestre la réponse inflammatoire est également marqué

par un déclin de son activité au cours du vieillissement. On parle alors d'« immunosenescence ». Cette dernière est associée à une augmentation des risques d'infection et d'apparition de maladies (Aw *et al.*, 2007).

En résumé, le vieillissement est un processus continu et irréversible de la détérioration de la fonctionnalité des organes. Il est notamment lié à l'accumulation, tout au long de la vie, de dommages cellulaires, à l'apparition de l'*inflammaging*, à la diminution des capacités de réparation tissulaire, et par conséquent à l'apparition d'une fibrose (Figure 8).

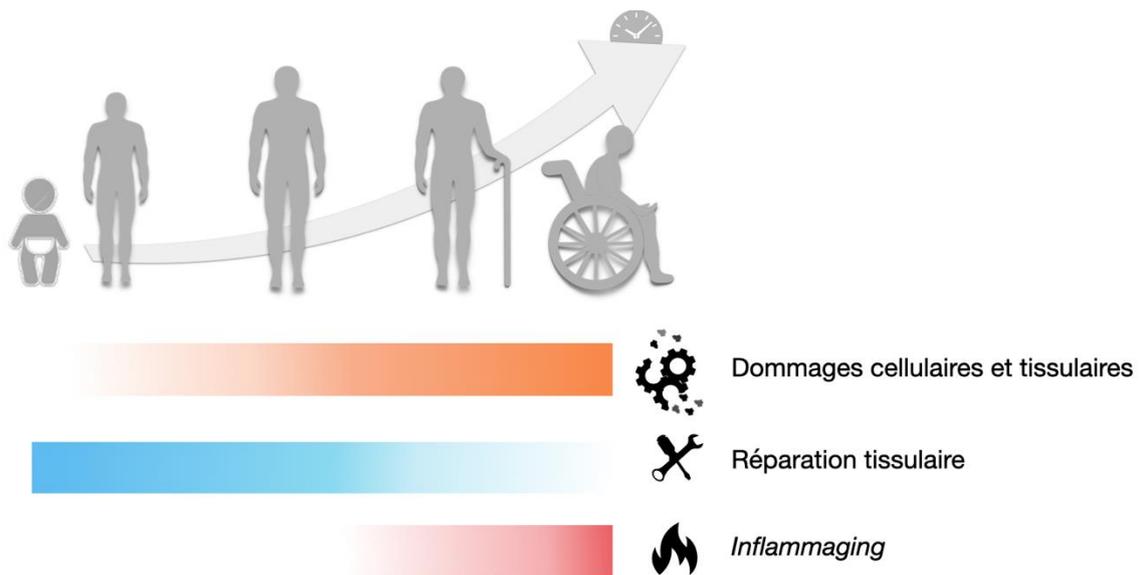


Figure 8. Illustration des caractéristiques impactées au cours du vieillissement.

Le vieillissement est caractérisé par une accumulation des dommages cellulaires et tissulaires au cours du temps, une détérioration de la réparation tissulaire et un état inflammatoire chronique, ou « inflammaging ».

Chapitre 2. Réponse inflammatoire

I. La réponse inflammatoire, un mécanisme complexe et coordonné

A. Généralités

1. Historique

Les premiers travaux sur l'inflammation datent du premier siècle. Un des premiers à définir les paramètres de l'inflammation est Cornelius Celsus qui compte parmi les plus grands médecins de l'antiquité aux côtés d'Hippocrate. Il décrit les quatre signes cardinaux de l'inflammation, rougeur, gonflement, chaleur et douleur (en latin : « *rubor et tumor cum calore et dolore* ») (Silva, 1978). En 1871, Rudolf Virchow ajoute la notion de perte de fonction. A cette époque l'inflammation est perçue comme étant un phénomène pathologique. Ce n'est qu'en 1908 que cette vision change, notamment grâce à Elie Metchnikoff (1845-1916) qui introduit le concept de la phagocytose (Annales de l'Institut Pasteur : p. 199, 1887). La phagocytose est un mécanisme physiologique qui permet de capturer des débris cellulaires et des pathogènes par des cellules qui sont dites « phagocytes ». Pour ses travaux, il obtient le prix Nobel en 1908. A partir de là, l'inflammation n'est plus considérée comme une réponse pathologique de l'organisme mais comme une réponse cellulaire importante de défense face aux pathogènes (Scott, 2004).

2. Définition

L'inflammation est une réponse de l'organisme qui se dit essentielle. Que ce soit dans un contexte d'infection ou à la suite d'un dommage tissulaire, la capacité d'un organisme à maintenir son équilibre repose en partie sur cette activité inflammatoire (Meizlish *et al.*, 2021). Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, la réponse inflammatoire est rapidement déclenchée dans l'objectif de combattre, dans certains cas, l'infection, de débarrasser le tissu lésé des débris cellulaires et matriciels, et de retrouver un tissu sain.

La réponse inflammatoire n'est cependant pas limitée à la survenue d'une lésion tissulaire ou d'une infection. En effet, d'autres situations, comme un stress métabolique (obésité, diabète), sont associées à une production des marqueurs associés à l'inflammation (Antonelli and Kushner, 2017; Meizlish *et al.*, 2021). Dans ce manuscrit, nous nous focalisons essentiellement sur la réponse inflammatoire induite à la suite d'une lésion tissulaire.

B. Implication du système immunitaire dans la réponse inflammatoire

Le système immunitaire se définit comme « l'ensemble des organes, tissus, cellules et molécules assurant l'immunité d'un organisme » (dictionnaire *Larousse*). C'est une composante complexe de l'organisme impliquée dans la majorité des situations physiopathologiques.

D'une façon générale, la réponse de l'organisme face à un stress, qu'il soit induit par des micro-organismes ou par un dommage tissulaire, entraîne l'activation des cellules du système immunitaire. Ces cellules produisent des médiateurs inflammatoires (signaux chimiques) qui agissent sur des tissus cibles afin d'induire une réponse adaptée face à l'agression (Figure 9) (Medzhitov, 2010).

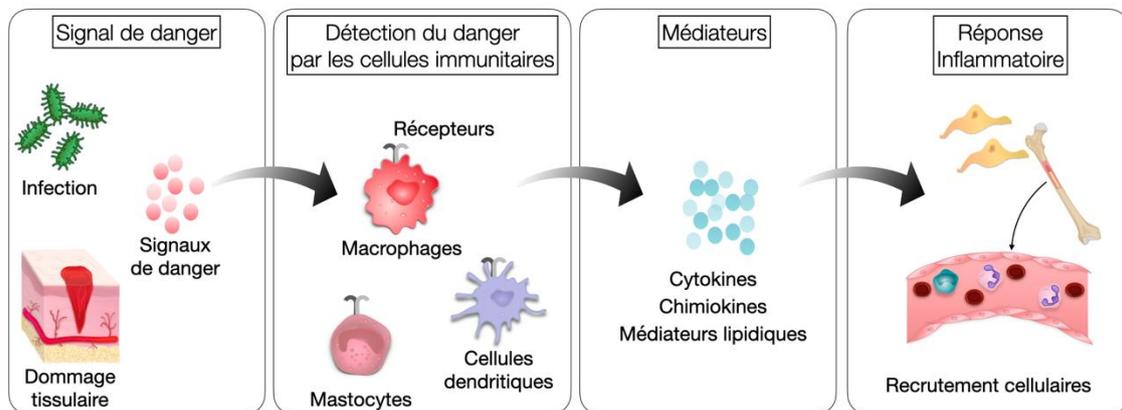


Figure 9. Représentation simplifiée de la voie de signalisation de l'inflammation.

La réponse inflammatoire est initialement induite par la présence, dans le milieu extracellulaire, de signaux de danger. Ces signaux sont reconnus par un ensemble de cellules du système immunitaire qui vont alors s'activer et induire la réponse inflammatoire en libérant des médiateurs (cytokines, chimiokines par exemple) inflammatoires. Ces médiateurs induisent le recrutement de nouvelles cellules immunitaires provenant notamment de la circulation sanguine. L'illustration est inspirée de Medzhitov, R. (2010) « *Inflammation 2010: new adventures of an old flame* », *Cell*.

Par définition, le système immunitaire est structuré en 2 composantes :

- L'**immunité innée** constitue la première ligne de défense de l'organisme face à un danger (Hoffmann and Akira, 2013; Parkin and Cohen, 2001). Son activité est non spécifique et est initiée dès la détection du danger par les cellules dites « sentinelles » qui résident dans les tissus. Elle implique un large spectre d'acteurs cellulaires spécialisés, dont les neutrophiles et les macrophages, provenant de la lignée myéloïde. Leur rôle au cours de la réponse inflammatoire sera détaillé dans la partie suivante du manuscrit.
- L'**immunité adaptative**, ou acquise, est présente chez tous les vertébrés à mâchoire (Boehm, 2011; Cooper and Alder, 2006). Son activité intervient quelques jours après le déclenchement de la réponse immunitaire innée. Contrairement à cette dernière, c'est une réponse spécifique. En effet, les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T, cellules B) reconnaissent des motifs moléculaires particuliers présentés sur la membrane des pathogènes.

Outre l'activité clé des cellules de l'immunité innée, de nombreux travaux ont mis en évidence l'implication des lymphocytes T dans la réparation tissulaire et notamment dans la mise en place de la fibrose (Li *et al.*, 2018; Adusei *et al.*, 2021). Par ailleurs, certains lymphocytes T participent au contrôle de l'homéostasie tissulaire en résidant au sein des tissus enfin de constituer une « mémoire immunitaire ». Ils peuvent ainsi induire une première réponse immunitaire spécifique suite à la détection de pathogènes dans le tissu (Kok *et al.*, 2022; Barros *et al.*, 2022).

C. Dynamique de la réponse inflammatoire

1. Introduction

La dynamique de la réponse inflammatoire a été brièvement introduite dans le premier chapitre de ce manuscrit. Pour rappel, la réponse inflammatoire est composée de deux phases. La première phase est dite inflammatoire. Elle est caractérisée par un afflux des cellules de l'immunité innée au niveau du site lésé et par un micro-environnement inflammatoire. La seconde phase, dite de résolution de l'inflammation, est essentielle pour permettre la réparation tissulaire. Elle est caractérisée par un changement d'activité des cellules immunitaires et du micro-environnement qui devient pro-résolutif.

Au cours des phases précoces de la réponse inflammatoire, l'activité prépondérante est marquée par un recrutement et une activité importante des neutrophiles et des macrophages (Zhao *et al.*, 2016). De ce fait, nous présenterons brièvement la dynamique de ces populations, bien que le rôle des autres cellules de l'immunité innée (mastocytes, cellules dendritiques) ne doive pas être négligé.

2. Phase inflammatoire

a. Initiation de la réponse inflammatoire

Signaux de dangers

A la suite d'un évènement lésionnel, divers signaux de danger sont libérés au niveau du site lésé participant au recrutement des cellules de l'immunité. Parmi ces signaux on trouve notamment deux grandes classes de molécules qui sont essentielles au recrutement des cellules immunitaires innées, à savoir les DAMPs et les PAMPs.

Les **DAMPs**, correspondent à des motifs moléculaires associés au dommage. Ils alertent l'organisme de la présence d'un danger et initient la réponse inflammatoire. Ces motifs de danger sont de nature non-infectieuse. Ils peuvent être libérés à la suite d'une mort cellulaire par nécrose, par des cellules en condition de stress cellulaire ou bien libérés par la matrice extracellulaire (Frevert *et al.*, 2018; Chen and Nuñez, 2010). A l'état physiologique, les DAMPs sont localisés dans le milieu intracellulaire (Zindel and Kubes, 2020). En cas de dommage cellulaire, ils peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire, ou localisés au niveau de la membrane cellulaire de manière à être exposés dans le milieu extracellulaire. Certains DAMPs jouent un rôle crucial au cours de la réparation tissulaire. Parmi les plus étudiés on trouve la protéine nucléaire HMGB1 (« *High Mobility Group Box 1* ») qui, dans un état physiologique, joue un rôle structural dans la chromatine au sein du noyau de la cellule. Dans des conditions de stress, elle est sécrétée et acquiert une activité pro-inflammatoire en induisant l'amplification de la réponse inflammatoire par activation des cellules immunitaires résidentes dans le tissu. Elle favorise ainsi le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité innée (Chen and Nuñez, 2010; Yang *et al.*, 2017). Elle participe également à la migration et la prolifération cellulaire des cellules souches au cours de la réparation tissulaire (Palumbo *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007). L'adénosine triphosphate (ATP) fait également partie des DAMPs. Elle est associée au recrutement des macrophages au cours de la réponse inflammatoire et possède une activité pro-angiogénique (Vénéreau *et al.*, 2015). L'interleukine-1 α (IL-1 α) et IL-33 sont

également considérées comme des DAMPs, libérées dans le milieu extracellulaire après nécrose cellulaire et pouvant induire une activité pro-inflammatoire (Dinarello, 2018; Cayrol and Girard, 2014).

Les **PAMPs** sont des motifs moléculaires conservés, associés aux pathogènes. Ils sont également reconnus par les cellules de l'immunité, ce qui permet d'initier une réponse inflammatoire. La libération de ces PAMPs est ainsi observée au cours des réponses inflammatoires non stériles. Parmi ces motifs on trouve, entre autres, les lipopolysaccharides (LPS) et le mannose qui sont associés aux bactéries, ou encore les mannanes associés aux champignons, et les ARNdb associés aux virus (Chen and Hur, 2022; Gazi and Martinez-Pomares, 2009; Rosadini and Kagan, 2017).

Activation des cellules immunitaires

Les cellules du système immunitaire inné sont dotées d'un grand nombre de récepteurs capables de reconnaître les signaux de dangers (DAMPs, PAMPs).

Une des grandes familles de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, les **PRR** (« *Pattern Recognition Receptors* »), permet la reconnaissance de ces signaux de danger et participe à l'initiation de la réponse inflammatoire (Li and Wu, 2021; Zindel and Kubers, 2020). Parmi ces récepteurs on trouve la famille des récepteurs TLRs (« *Toll-Like Receptors* »), (TLR1-TLR10) qui permet la reconnaissance d'une grande partie des motifs associés aux bactéries et virus. Ces TLRs vont induire une réponse antimicrobienne en produisant des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Sabroe *et al.*, 2008; Doyle *et al.*, 2004). On trouve également les récepteurs NLRs (« *Nod-Like Receptors* ») qui sont impliqués dans la formation de complexes protéiques qu'on nomme « *inflammasome* » (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7) (Canton *et al.*, 2013; Zhong *et al.*, 2013; Kawasaki and Kawai, 2014; Taban *et al.*, 2022). Cet *inflammasome* contrôle la libération de médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-1 β , participant à l'activation des processus inflammatoires (Rathinam and Fitzgerald, 2016).

Les récepteurs scavengers (CD36, MARCO, TIM-4) qui sont considérés comme une sous-classe des PRR (Canton *et al.*, 2013), participent à la reconnaissance des DAMPs, mais aussi des motifs associés aux bactéries. Ces récepteurs permettent de débarrasser le site lésé des microorganismes, des débris, et des cellules apoptotiques en effectuant l'endocytose ou encore la phagocytose (Zani *et al.*, 2015).

Les cellules immunitaires sont également dotées de récepteurs aux opsonines. Les opsonines sont des protéines solubles (fibronectine, anticorps, complément) qui se fixent sur la membrane de l'agent infectieux. Ce dernier étant « marqué », autrement dit « opsonisé », il favorise sa

reconnaissance par les phagocytes *via* des récepteurs tels que les FcR (« *Fc Receptors* ») et les récepteurs au complément. Ces récepteurs aux opsonines permettent ainsi la phagocytose des agents pathogènes (Uribe-Querol and Rosales, 2020).

Les premières cellules du système immunitaire à être activées sont les cellules résidentes dans les tissus, à savoir les macrophages, les cellules dendritiques, ainsi que les mastocytes (Krystal-Whittemore *et al.*, 2016; Gray and Farber, 2022). Ces cellules agissent comme des sentinelles dans le tissu. Leur activation, par contact avec des DAMPs ou PAMPs, est responsable de la libération d'un panel de médiateurs inflammatoires dont des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des médiateurs lipidiques et des histamines. L'ensemble des médiateurs sécrétés induit un gradient chimique et un environnement pro-inflammatoire au sein du site lésionnel ce qui permet respectivement de recruter et d'activer les cellules immunitaires (Furze and Rankin, 2008; Metzemaekers *et al.*, 2020; García-Ramallo *et al.*, 2002; Kratožil *et al.*, 2017).

Perméabilité vasculaire

L'initiation de la réaction inflammatoire est caractérisée par une perméabilisation des vaisseaux sanguins. Celle-ci est provoquée à la suite de la libération des médiateurs pro-inflammatoires par les cellules immunitaires, à savoir l'histamine, la bradykinine et les modulateurs de la perméabilité comme la sphingosine-1-phosphate et la substance P entre autres (Claesson-Welsh *et al.*, 2021). Cette perméabilité vasculaire, associée à une augmentation du débit sanguin local, favorise le recrutement rapide des neutrophiles et des monocytes qui sont attirés par un gradient chimiotactique mis en place par la libération des différentes chimiokines participant à la migration cellulaire (Figure 10) (Charo and Ransohoff, 2006). Ce gradient chimiotactique permet d'activer et d'attirer les cellules immunitaires vers la source du dommage.

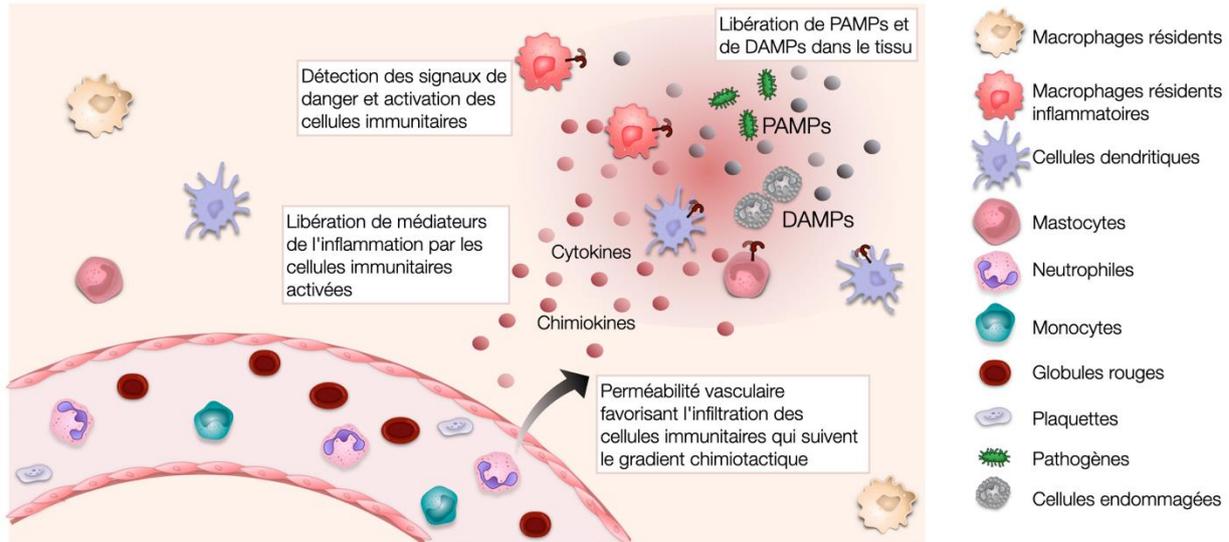


Figure 10. Activation de la réponse inflammatoire.

La réponse inflammatoire est déclenchée à la suite d'une libération de PAMPs et/ou de DAMPs, par les pathogènes et les débris cellulaires respectivement. Les cellules immunitaires initialement présentes dans le tissu vont s'activer et libérer de nombreux médiateurs de l'inflammation. Ces médiateurs vont participer au recrutement de nouvelles cellules du système immunitaire inné au niveau du foyer inflammatoire.

b. Dynamique de la phase inflammatoire

La phase inflammatoire est orchestrée par un recrutement séquentiel et ordonné de différentes cellules inflammatoires comprenant des cellules mono- et plurinucléées. C'est un processus dynamique qui est contrôlé dans le temps et qui implique aussi bien l'arrivée de cellules immunitaires que la production de molécules aux propriétés pro-inflammatoires. L'ensemble de ces effecteurs génère un micro-environnement qui est dit inflammatoire au niveau du site lésionnel. La majorité des études décrivant l'évolution au cours du temps du nombre de cellules immunitaires présentes sur le site de la lésion, ainsi que les diverses molécules sécrétées, a été réalisée sur le petit mammifère. Ces données de cinétique peuvent varier en fonction du tissu, de l'intensité de la lésion (partielle jusqu'à une ablation), et du type de lésion (chimique, mécanique).

Les **neutrophiles** sont les premières cellules recrutées sur le site lésé. Ils sont mobilisés en quelques minutes du compartiment sanguin jusqu'au tissu pour atteindre un pic de recrutement autour de la 20^{ème} heure suivant l'évènement (Kim *et al.*, 2008). Ce recrutement est médié par la présence dans le milieu extracellulaire de médiateurs pro-inflammatoires, à savoir des

cytokines comme IL-1 β , TNF- α (« *Tumor Necrosis Factor α* »), IFN- γ (Interféron- γ), TGF- β (« *Transforming Growth Factor* »), et des chimiokines telles que le CXCL1, CXCL10. Ces médiateurs sont initialement libérés par les cellules immunitaires résidentes au sein du tissu, comme les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, et également par les péricytes (cellules mésenchymateuses localisées au niveau de l'endothélium vasculaire) (Kim and Luster, 2015; Eming *et al.*, 2007). L'arrivée, en quelques minutes, de nouvelles cellules immunitaires inflammatoires activées induit une amplification de la production des médiateurs inflammatoires. L'augmentation du nombre de médiateurs chimioattractants accélère la vitesse de recrutement des neutrophiles mais aussi des monocytes et des macrophages. Ainsi, les neutrophiles vont rapidement atteindre un recrutement maximal approximativement 12 heures après lésion.

Dans le cas d'une lésion non stérile, les neutrophiles reconnaissent et phagocytent les pathogènes présents sur le site lésé et les débris cellulaires générés par la lésion. Ils libèrent par dégranulation des médiateurs (protéases, lysozyme, lactoferrine) qui entraînent la formation d'un milieu hostile à la survie des agents pathogènes. Ils produisent également des structures protéiques appelées NET (« *Neutrophil Extracellular Traps* ») permettant de capturer les micro-organismes et d'éviter leur dissémination (Winterbourn *et al.*, 2016; Phillipson and Kubes, 2019). Un autre mécanisme antimicrobien est la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : « *Reactive Oxygen Species* ») qui induisent un stress oxydatif environnemental avec pour conséquence la destruction des pathogènes. Ces ROS peuvent également provoquer l'activation du mécanisme d'apoptose des cellules saines avoisinantes (Aratani, 2018; Belambri *et al.*, 2018). A noter que les ROS, produits aussi bien par les neutrophiles que par les macrophages, sont également libérés lors d'une inflammation stérile. Les voies de signalisation impliquées sont les mêmes lors d'une inflammation stérile, ou en présence de pathogènes (Chen and Nuñez, 2010; Kubes and Mehal, 2012). Les ROS amplifient également la production des médiateurs pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF- α , IL-1) participant au recrutement des cellules immunitaires. Parmi ces médiateurs, le peptide anti-microbien LL-37 (« *cathelicidin-derived antimicrobial peptide* ») et les protéines liants l'héparine (HBP : « *Heparin-Binding Protein* ») ou la chimiokine MCP-1 (« *Monocyte Chemoattractant Protein-1* », autrement nommé CCL2) participent au recrutement actif des monocytes (Soehnlein *et al.*, 2008; Gschwandtner *et al.*, 2019).

L'arrivée des neutrophiles sur le site de lésion est suivie quelques minutes plus tard par un recrutement des **monocytes** provenant également de la circulation sanguine. Ces monocytes participent à l'initiation de la réponse inflammatoire en libérant des chimiokines et des

cytokines inflammatoires telles que le TNF- α . Durant cette phase inflammatoire, les monocytes représentent la population la plus importante des cellules mononucléées (Jakubzick *et al.*, 2017). Ces monocytes, qui quittent le compartiment sanguin, arrivent dans un environnement tissulaire inflammatoire et se différencient en **macrophages** (Kratofil *et al.*, 2017). Dans ce contexte inflammatoire, les macrophages détectent les DAMPs et les PAMPs présents dans le micro-environnement. Cette reconnaissance, ainsi que la présence de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, induit l'activation et la polarisation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire, classiquement décrit « M1 ». Ils produisent alors un ensemble de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 β , IFN- γ , IL-12, TNF- α et des chimiokines comme CXCL1 entre autres (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). A noter que les monocytes et les macrophages sont la principale source des cytokines inflammatoires (Arango Duque and Descoteaux, 2014; Chawla *et al.*, 2011).

Les macrophages M1 jouent un rôle important de défense face aux pathogènes. Ils ont la particularité de présenter des fonctions antimicrobiennes en phagocytant les pathogènes et en produisant des ROS notamment par l'activation des récepteurs TLR présents à leur surface (TLR1, TLR2, TLR4) (West *et al.*, 2011). Ils exercent un rôle de clairance du tissu lésé en phagocytant les débris cellulaires (Arango Duque and Descoteaux, 2014; Treffkorn *et al.*, 2004). Ils jouent également un rôle dans la réaction immunitaire adaptative. En effet, les macrophages font partie des cellules présentatrices d'antigènes et sont donc impliqués dans l'activation des lymphocytes T (Roche and Furuta, 2015). En terme de population, le nombre de macrophages sur le site lésé croît jusqu'à atteindre un nombre maximal entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour (Novak and Koh, 2013a).

La fin de la phase inflammatoire, 24 à 48 heures post-lésion, est notamment marquée par un ralentissement du recrutement des neutrophiles et de la production des médiateurs pro-inflammatoires.

3. Phase résolutive

La phase inflammatoire est nécessaire à la clairance du tissu. Cependant, c'est une phase qui doit être transitoire afin que le tissu récupère son état d'équilibre. Une persistance de la phase inflammatoire est à l'origine de l'inflammation chronique qui est rencontrée dans les plaies chroniques notamment. De façon similaire à la phase inflammatoire, la phase résolutive, qui débute approximativement 24 heures après la lésion, est coordonnée et régulée par un ensemble de cellules aux profils bien particuliers et à la libération de molécules spécifiques.

La phagocytose des pathogènes par les neutrophiles inhibe leur propre survie favorisant ainsi leur entrée en apoptose (Geering and Simon, 2011). L'apoptose des neutrophiles guide leur propre élimination en orientant les autres cellules de l'immunité par présentation d'un signal de recrutement couramment nommé « *find-me* » (« trouve-moi »). Ce signal favorise l'attraction des phagocytes et est suivi par la génération d'un signal de reconnaissance nommé « *eat-me* » (« mange-moi »). Ce signal permet aux phagocytes de reconnaître, grâce au récepteur TIM-4, la phosphatidylserine exprimée sur la membrane des corps apoptotiques (Min *et al.*, 2020). Après fixation, la dégradation du corps apoptotique est effectuée (Ravichandran, 2010; Elliott *et al.*, 2009). L'action de capture et d'élimination des neutrophiles apoptotiques par les macrophages est définie par un terme spécifique, l'efférocytose. L'apoptose des neutrophiles et leur efférocytose sont des marqueurs de la résolution de l'inflammation (Sugimoto *et al.*, 2016; Ortega-Gómez *et al.*, 2013). Au cours de cette phase de résolution, divers mécanismes, tels que la protéolyse des signaux inflammatoires mais également la dégradation des NET, permettent un ralentissement de l'afflux des neutrophiles. Il est également proposé que les neutrophiles retournent dans la circulation sanguine (Buckley *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017). Ce ralentissement du recrutement, associé à leur entrée en apoptose et à leur efférocytose, marque une diminution de la population totale de neutrophiles actifs. Il est ainsi proposé dans la littérature que cette phase de résolution peut être définie histologiquement par l'intervalle entre le niveau maximal de neutrophiles présents dans le tissu et le moment où ces cellules disparaissent (Serhan *et al.*, 2007).

Le mécanisme d'efférocytose induit un changement de phénotype des macrophages inflammatoires. Ces derniers acquièrent des caractéristiques pro-résolutives, couramment nommées « M2 » dans la littérature (Wculek *et al.*, 2022; Kornis *et al.*, 2011). Cette modification de profil phénotypique est associée à une modification du profil sécrétoire. Les macrophages M2 libèrent des médiateurs anti-inflammatoires, tels que l'IL-10 et le TGF- β , qui inhibent la production, par les cellules immunitaires, des médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α (Elliott *et al.*, 2017). A la suite de l'efférocytose, ils libèrent également des facteurs pro-résolutifs, comme par exemple le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), qui permettent la prolifération cellulaire et le remodelage au cours de la réparation tissulaire (Lu *et al.*, 2020; Grinton *et al.*, 2022). Les macrophages ont donc un rôle central en permettant une clairance du tissu et ainsi une résolution de l'inflammation.

Les médiateurs pro-résolutifs, les SPM (« *Specialized Pro-Resolving Mediators* »), ont des rôles importants au cours de la résolution de l'inflammation. Par exemple, les resolvines E1 et D1, ou encore la lipoxine A4, participent à l'inhibition de la migration des neutrophiles et

favorisent leur efférocytose (Basil and Levy, 2016; Schwab *et al.*, 2007; Serhan, 2014). Par ailleurs, l'intensité des réponses pro- et anti-inflammatoires doit être contrôlée (Hietbrink *et al.*, 2006). Il est suggéré dans la littérature que de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, actifs durant la phase initiale de l'inflammation, peuvent initier un programme de résolution. Cela suppose qu'une résolution efficace de l'inflammation est en partie la résultante de l'activité pro-inflammatoire coordonnée par les cellules immunitaires (Serhan and Savill, 2005; Sugimoto *et al.*, 2016).

Ainsi, au cours de cette phase résolutive, la population des macrophages continue à croître jusqu'à la fin de la phase de résolution (approximativement au 3^{ème} jour après la lésion). Le nombre de macrophages au profil anti-inflammatoire va diminuer au profit d'une augmentation du nombre de macrophages au profil résolutif.

En résumé, cette phase est essentielle et permet un retour à l'homéostasie. Elle est notamment marquée par un changement du profil sécrétoire au sein du tissu lésé et un arrêt du recrutement des neutrophiles accompagné de leur entrée en apoptose. Cette étape résolutive est également associée au nettoyage du tissu par le mécanisme d'efférocytose favorisant la reprogrammation des macrophages, passant d'un phénotype classiquement activé « M1 » en un phénotype alternatif « M2 », autrement dit résolutif. Elle se termine avec la diminution du nombre de macrophages anti-inflammatoires sur le site lésé. Une partie de ces macrophages émigre dans le système lymphatique, une autre partie devient réparatrice au sein du tissu, enfin, certains entrent en apoptose (Gautier *et al.*, 2013).

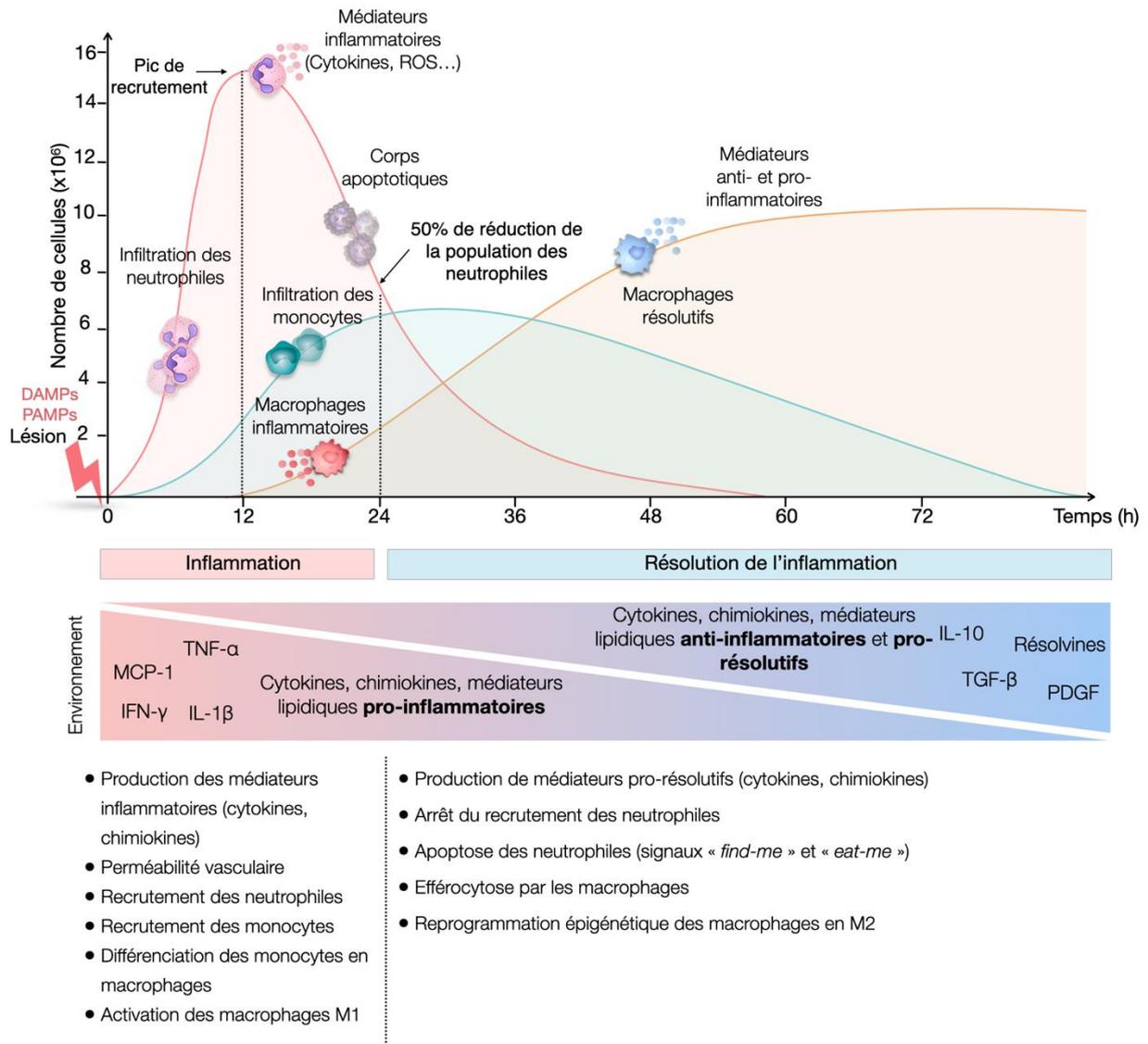


Figure 11. Dynamique de la réponse inflammatoire.

La phase inflammatoire se déroule en deux étapes : 1) une étape inflammatoire caractérisée par un important recrutement de cellules de l'immunité innée. Les neutrophiles arrivent rapidement sur le site lésionnel et produisent un grand nombre de médiateurs inflammatoires (cytokines, chimiokines, ROS). Ils sont accompagnés par un recrutement des monocytes qui se différencient en macrophages. L'environnement très inflammatoire oriente ces macrophages vers un profil pro-inflammatoire, caractérisé par la production d'un grand nombre de médiateurs inflammatoires et la phagocytose. 2) La résolution de l'inflammation est marquée par un arrêt de recrutement des neutrophiles sur le site lésionnel, et un changement de profil phénotypique et sécrétoire des macrophages qui deviennent alors anti-inflammatoires.

En conclusion, ce processus inflammatoire est un mécanisme dynamique non linéaire et rapide. Il est marqué par un recrutement séquentiel et une activité coordonnée dans le temps des différentes populations cellulaires immunitaires (Figure 11). La durée de la phase inflammatoire et de la phase résolutive doit être contrôlée afin de retrouver un état d'équilibre tissulaire et éviter l'apparition d'une inflammation chronique. Bien que le rôle des neutrophiles soit démontré dans la littérature, il est également bien établi qu'un des acteurs pivot de cette réponse inflammatoire est le macrophage. Ces macrophages permettent d'initier ce mécanisme notamment en se trouvant initialement dans le tissu et en détectant les premiers signaux de danger. Leur recrutement participe à l'amplification de la réponse inflammatoire par libération de cytokines (Murray and Stow, 2014). Ils contrôlent la réponse immunitaire et contribuent à la résolution de l'inflammation (Austermann *et al.*, 2022).

La résolution de l'inflammation, qui est nécessaire pour réparer le tissu lésé, n'est possible que grâce à une modification du profil sécrétoire des macrophages et une clairance des neutrophiles apoptotiques par les macrophages (Serhan *et al.*, 2015; Sugimoto *et al.*, 2016). Ce mécanisme clé d'efférocytose par les macrophages permet ce changement phénotypique et fonctionnel des macrophages inflammatoires vers un profil réparateur (Fox *et al.*, 2010; Greenlee-Wacker, 2016; Kourtzelis *et al.*, 2020). L'environnement réparateur devient ainsi favorable à la reconstruction du tissu.

Dans la suite de ce manuscrit nous nous sommes intéressés aux macrophages qui jouent un rôle clé au cours de cette réponse inflammatoire.

II. Les macrophages, des cellules centrales du processus inflammatoire au cours de la réparation tissulaire

Le macrophage a été observé pour la première fois en 1883 par Elie Metchnikoff qui décrit une cellule contenant un noyau de grande taille, capable de se déplacer et de phagocyter. Cette étonnante capacité leur a valu le nom de « gros mangeur ». Ces observations sont notamment répertoriées dans les annales de l’Institut Pasteur (Annales de l’Institut Pasteur : p. 199, 1887). La fonction clé, et la plus décrite, des macrophages est la phagocytose. Cependant ce sont également des cellules sentinelles du système immunitaire inné. Elles sont capables, comme nous l’avons évoqué, de détecter des signaux de danger et d’initier ainsi une réponse cellulaire. Nous verrons par la suite que ces macrophages sont des cellules dotées d’une grande plasticité et flexibilité qui se définissent par leur capacité à s’adapter au micro-environnement et à induire des réponses spécifiques.

Depuis cette découverte, les macrophages ont fait l’objet de nombreux sujets de recherche comme en témoigne le nombre grandissant de publications sur la base de données bibliographique de *PubMed* (regroupe l’ensemble des domaines de la biologie et de la médecine) (Figure 12).

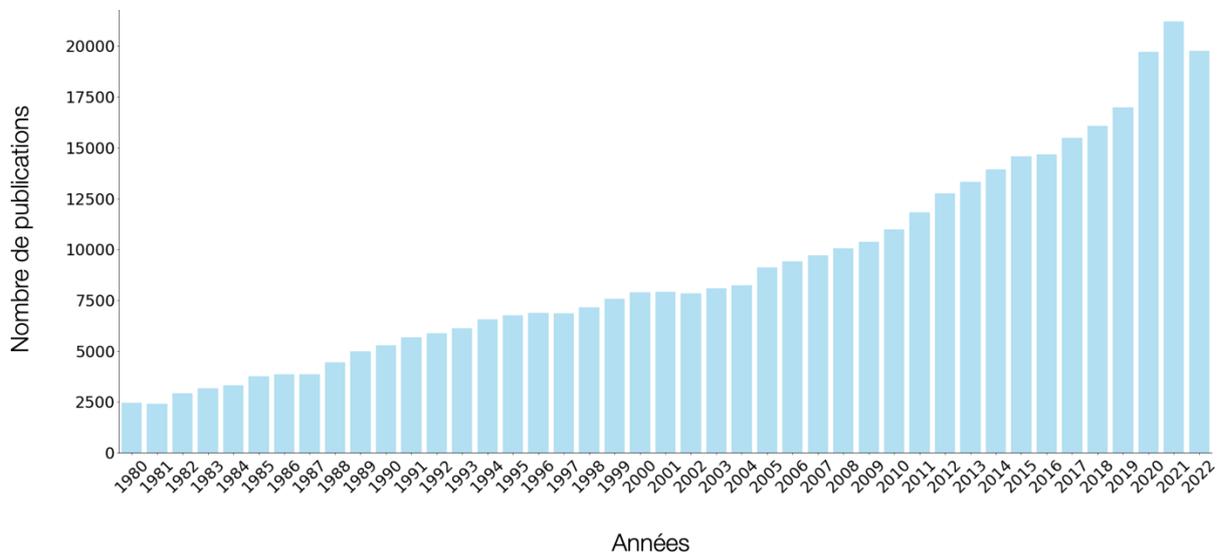


Figure 12. Nombre de publications scientifiques sur le macrophage.

Cette analyse a été effectuée sur la base de données PubMed. Elle regroupe le nombre de publications par an, allant de 1980 jusqu’à 2022, incluant le mot-clé « (macrophage) » (requête effectuée le 10 décembre 2022).

A. Hétérogénéité des macrophages

Outre leur rôle clé tout au long du processus de réparation, les macrophages sont les garants de l'homéostasie tissulaire. Ils sont donc présents physiologiquement dans les tissus où ils assurent un rôle de sentinelle et sont capables d'initier la réponse inflammatoire en présence de danger. Il existe en réalité deux types de macrophages : les macrophages dérivés des monocytes (initialement produits dans la moelle osseuse) et les résidents tissulaires qui ont une origine embryonnaire. Ces deux types de macrophages présentent à la fois des caractéristiques communes et des différences phénotypiques et fonctionnelles.

1. Origine des macrophages

a. Les macrophages dérivés des monocytes

Les macrophages recrutés au cours de la réponse inflammatoire proviennent de la différenciation des monocytes. Ces monocytes présents dans la circulation sanguine sont issus de l'hématopoïèse, un processus physiologique de production des cellules sanguines.

b. Les macrophages résidents

i. Origine des macrophages résidents

Depuis quelques années, le modèle classique selon lequel les macrophages résidant dans les tissus proviennent et sont continuellement renouvelés par les monocytes issus de la circulation sanguine (Furth *et al.*, 1972), est remis en cause. De nombreuses études ont récemment démontré que les macrophages résidant dans le cerveau, les poumons et le foie dérivent de précurseurs embryonnaires, apparus au cours de l'embryogenèse (Ginhoux and Guilliams, 2016; Ginhoux and Jung, 2014). Dans les conditions physiologiques, certaines populations de macrophages résidents sont capables de proliférer (Hashimoto *et al.*, 2013; Guilliams *et al.*, 2020). C'est notamment le cas des macrophages résidant dans le cerveau, l'épiderme, le foie, la rate et le poumon. En revanche, dans d'autres tissus tels que l'intestin, le péritoine, le derme ainsi que le cœur, les macrophages proviennent essentiellement de la différenciation des monocytes (Epelman *et al.*, 2014; Guilliams and Svedberg, 2021; Lee and Ginhoux, 2022). La compréhension des différentes fonctions des macrophages au sein d'un tissu nécessite de tenir compte des différences d'origine de ces cellules qui pourraient expliquer les différences de fonctionnalité.

ii. Les différents types de macrophages résidents

Depuis ces avancées, la recherche sur le rôle des macrophages résidents ne cesse de croître, comme en témoigne le nombre croissant de publications (Figure 13).

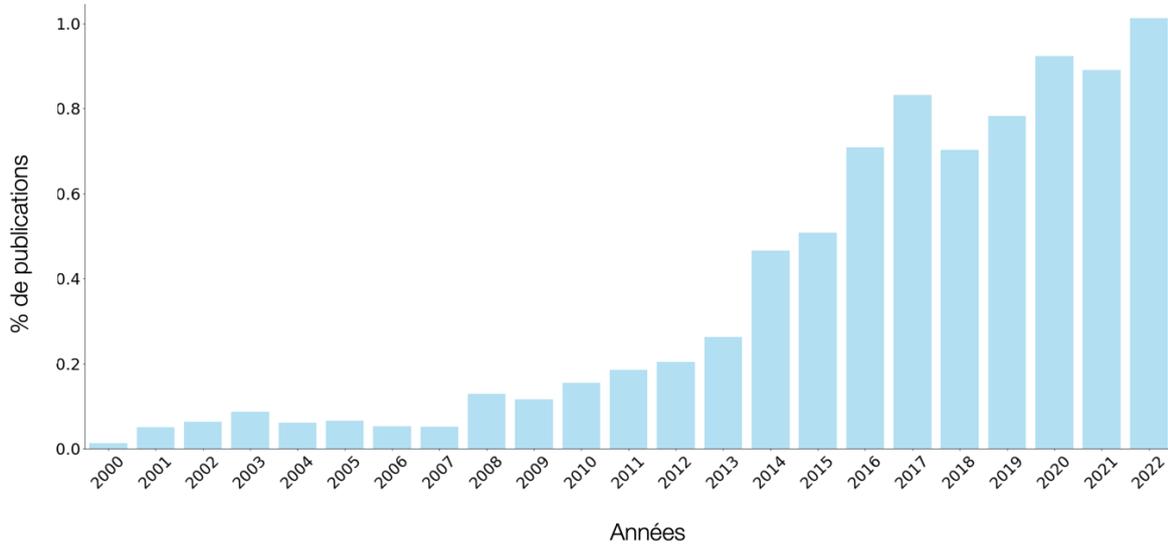


Figure 13. Pourcentage de publications scientifiques sur l'étude des macrophages résidents.

Cette analyse a été effectuée avec la recherche avancée de la base de données PubMed entre 2000 et 2022. Le nombre de publications scientifiques incluant les termes « ((tissue-resident) AND (macrophage)) » a été ramené au nombre total de publications incluant le mot clé « (macrophage) » (en pourcentage) (Requête effectuée le 10 décembre 2022).

Les macrophages tissulaires sont retrouvés dans une grande majorité de tissus. Quel que soit le tissu où ils sont localisés, les macrophages résidents partagent des caractéristiques communes. Leur principal rôle est le contrôle de l'homéostasie tissulaire. Lorsqu'ils détectent un signal de danger, ils participent à l'initiation de la réponse inflammatoire et aux mécanismes de défense en effectuant la phagocytose des microorganismes, des débris cellulaires, des cellules sénescentes et participent au remodelage tissulaire (Cummings *et al.*, 2016). Par ailleurs, en fonction du tissu hôte, ou micro-environnement, ces macrophages sont caractérisés par des profils épigénétiques et transcriptomiques distincts. Ils présentent alors des rôles spécifiques, particulièrement adaptés au milieu dans lequel ils sont localisés (Figure 13) (Lee and Ginhoux, 2022). Au sein d'un même tissu, plusieurs populations de macrophages coexistent en fonction de leur localisation dans le tissu (à proximité de la circulation sanguine, ou encore en interaction avec des cellules spécialisées). Cette hétérogénéité souligne leur capacité à s'adapter à l'environnement dans lequel ils se trouvent (Figure 14).

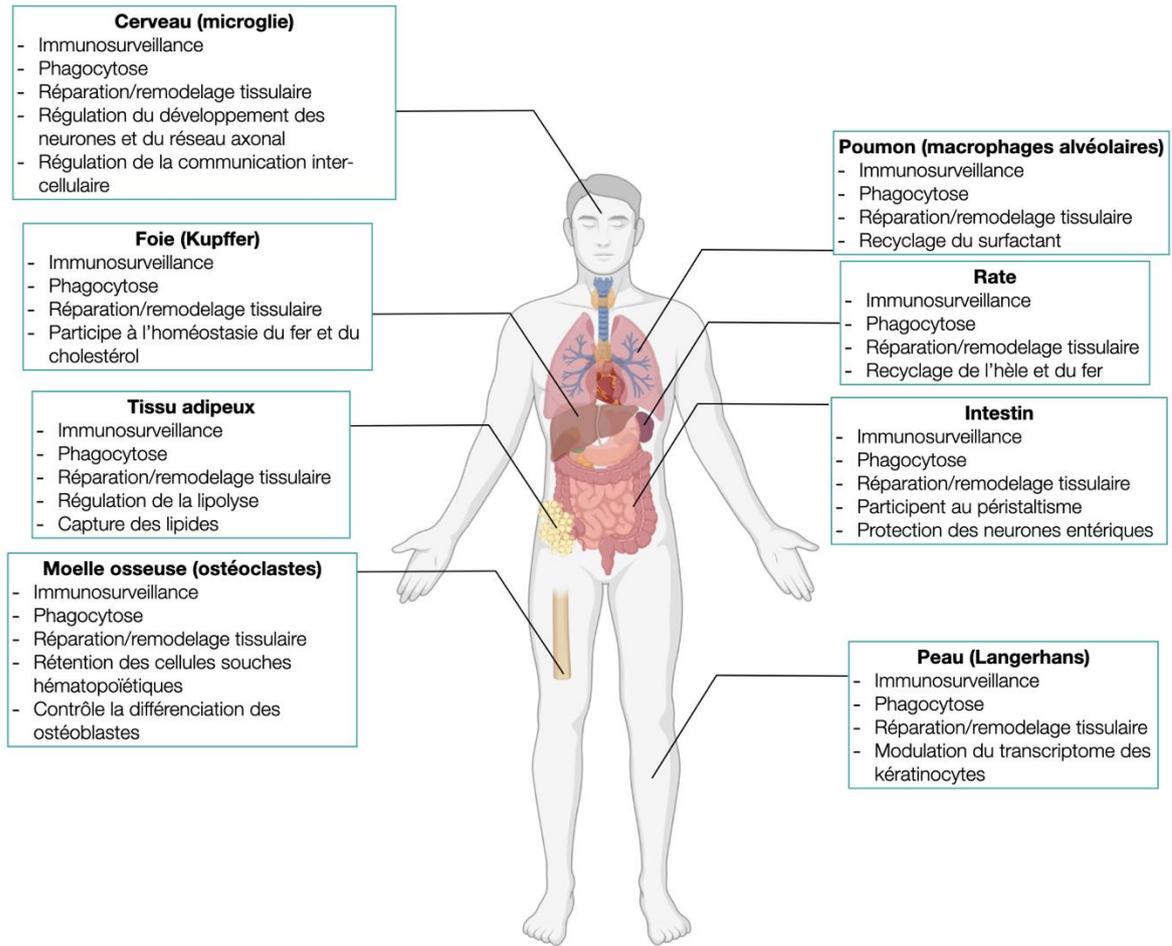


Figure 14. Diversité fonctionnelle des macrophages résidents.

Les macrophages résidents sont présents dans la grande majorité des tissus de l'organisme. Au sein de ces différents tissus, ils ont des propriétés fonctionnelles communes comme l'immunosurveillance et la phagocytose, et favorisent la réparation et le remodelage tissulaire dans des conditions inflammatoires. Ils présentent également des différences épigénétiques et transcriptomiques en fonction du tissu où ils se trouvent. Cette illustration présente quelques rôles de ces macrophages résidents en fonction de leur localisation.

Cerveau

Au sein du système nerveux central, les macrophages sentinelles sont nommés les cellules de la microglie et représentent environ 10% des cellules du système nerveux (cellules de soutien du tissu cérébral) (Hugh Perry, 1998; Sousa *et al.*, 2017). Comme tous les macrophages, la microglie joue un rôle crucial dans la première ligne de défense à la suite de l'apparition d'un danger. Ces cellules sont définies comme hautement dynamiques, avec la capacité d'émettre de longs prolongements afin d'interagir avec le milieu et les cellules avoisinantes dont les neurones (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Davalos *et al.*, 2005; Fontainhas *et al.*, 2011). Outre son rôle de

surveillance, il a notamment été démontré que la microglie peut jouer un rôle au niveau des synapses, zone de transmission de l'information entre deux neurones, grâce notamment à la libération de cytokines. Elle contribue ainsi à la modulation de la transmission synaptique (Vezzani and Viviani, 2015; Wake *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2010). Afin de réguler cette communication intercellulaire, les cellules de la microglie expriment des récepteurs aux neurotransmetteurs et aux neuropeptides (H. Liu *et al.*, 2016; Pocock and Kettenmann, 2007). La fixation de neurotransmetteurs sur ces récepteurs induit la libération de nombreux médiateurs, tels que des interleukines ou des facteurs comme le TNF- α , qui agissent sur la plasticité des neurones (Colonna and Butovsky, 2017). Au cours du développement embryonnaire, la microglie contrôle l'activité et le développement des réseaux neuronaux et des réseaux synaptiques (Lenz and Nelson, 2018; Schafer *et al.*, 2012; Parkhurst *et al.*, 2013). Elle libère également de nombreux médiateurs de l'inflammation et participe à la réparation et au remodelage tissulaire (Michell-Robinson *et al.*, 2015). Ces cellules microgliales interviennent dans les pathologies cérébrales comme les maladies neurodégénératives. Dans la maladie d'Alzheimer par exemple, la microglie est capable de phagocyter les plaques amyloïdes à l'origine de la maladie. Cependant, leur stimulation chronique favoriserait l'accumulation d'oligomères et participerait à l'inflammation chronique (Colonna and Butovsky, 2017; Guan *et al.*, 2022; Minogue *et al.*, 2014).

Os

Dans l'os, l'une des populations de macrophages résidents est désignée par le terme d'ostéoclastes. Les ostéoclastes ont la capacité de dégrader le tissu osseux permettant le remodelage du squelette et participent également au renouvellement permanent de l'os (Pederson *et al.*, 2008). Au cours des années 2000, la communauté scientifique s'est intéressée à leur rôle immunitaire (Madel *et al.*, 2019). Outre leur fonction de résorption osseuse, il a été démontré que les ostéoclastes ont la capacité d'induire une réponse immunitaire, notamment en activant les lymphocytes T (Ibáñez *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2010). Ils sont également impliqués dans la rétention des cellules souches hématopoïétiques au sein de la niche médullaire et dans leur recrutement vers la circulation sanguine (Miyamoto, 2013; Chow *et al.*, 2011). Enfin, ils contrôlent la différenciation des précurseurs des ostéoblastes (cellules de l'os productrices de matrice) (Boyce *et al.*, 2009). Une défaillance de l'activité de ces ostéoclastes conduit à l'ostéopétrose, tandis qu'une activité excessive peut amener à une ostéoporose (Dai *et al.*, 2002; Lau and Guo, 2011).

Foie

Les cellules de Kupffer constituent l'une des populations de macrophages résidents du foie. Le rôle clé des cellules de Kupffer est leur participation au nettoyage des pathogènes et des toxines issues de la circulation sanguine. En effet, les cellules de Kupffer sont en contact direct avec les bactéries et les toxines provenant du système gastro-intestinal et transportées par la veine porte jusqu'au foie (Bilzer *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 1987; Gola *et al.*, 2021). Ils participent ainsi à la défense de l'organisme en cas d'infection et à l'initiation de la réponse inflammatoire en induisant leur propre mort par nécroptose (une mort inflammatoire) après avoir effectué la phagocytose d'agents pathogènes (Blériot *et al.*, 2015). Ils participent également à l'homéostasie du fer en phagocytant les globules rouges (Theurl *et al.*, 2016; Terpstra and van Berkel, 2000). Les cellules de Kupffer sont également impliquées dans la régulation du cholestérol et le contrôle du métabolisme lipidique grâce à l'expression de CD36 (Blériot *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2015). Ces cellules ont un rôle essentiel dans le processus de réparation associé aux maladies hépatiques, notamment en libérant de nombreux médiateurs inflammatoires (Nguyen-Lefebvre and Horuzsko, 2016). Ils libèrent également des facteurs de croissance (HGF et IGF : « *Hepatocyte Growth Factor* » et « *Insulin-like Growth Factor* ») favorisant la régénération des hépatocytes (cellules constitutives du foie) (Wen *et al.*, 2021).

Poumon

Les macrophages résidents alvéolaires ont un rôle primordial dans l'homéostasie tissulaire. A noter qu'il existe une hétérogénéité fonctionnelle des macrophages résidents dans les poumons, définie par leur localisation au sein du tissu. Il existe notamment une population localisée dans les interstices alvéolaires qui exerce un rôle crucial de barrière en capturant puis en dégradant les pathogènes et irritants, et en initiant rapidement une réponse inflammatoire (Byrne *et al.*, 2015; Chacón-Salinas *et al.*, 2005; Gautier *et al.*, 2012; Garbi and Lambrecht, 2017). Ils sont à l'origine du recyclage du surfactant, un complexe moléculaire sécrété par les cellules alvéolaires (Trapnell and Whitsett, 2002).

Peau

Les cellules de Langerhans sont des cellules sentinelles de la peau, situées dans les couches basales de l'épiderme (West and Bennett, 2018). Leur principale fonction est la surveillance du tissu. A la détection d'un danger, les cellules de Langerhans initient la réponse inflammatoire et ont la capacité de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes afin d'activer les lymphocytes T

(Berger *et al.*, 2006). Elles jouent un rôle crucial dans la réparation cutanée en initiant le mécanisme de réparation et en migrant sur le site lésionnel. Il est notamment constaté une importante migration des cellules de Langerhans dans les plaies diabétiques en cours de guérison (Rajesh *et al.*, 2019; Stojadinovic *et al.*, 2013). Les cellules de Langerhans ont également un rôle de modulation du transcriptome des kératinocytes (Su *et al.*, 2020). La caractérisation de ces cellules est relativement récente (Hoeffel *et al.*, 2012). En effet, elles ont longtemps été associées à des cellules dendritiques de par leur fonction bien établie de présentation d'antigènes aux lymphocytes et de migration dans les organes lymphoïdes. A ce jour, le rôle de ces cellules n'est encore que peu exploré (Lee and Ginhoux, 2022).

Rate

Plusieurs sous-populations de macrophages existent dans la rate. Parmi elles, on trouve des macrophages localisés au niveau de la pulpe rouge. Ces macrophages ont pour rôle clé la phagocytose des érythrocytes sénescents. Cette dégradation permet le recyclage de l'hème et du fer, des éléments constitutifs des globules rouges. Cette phagocytose est possible grâce à une forte expression des gènes impliqués dans la capture des globules rouges circulants et de la régulation du fer (Sukhbaatar and Weichhart, 2018; Klei *et al.*, 2017; Kohyama *et al.*, 2009).

Intestin

Dans l'intestin, les macrophages résidents peuvent être localisés dans les différentes couches de l'épithélium intestinal et tout le long du tractus gastro-intestinal. La plus grande densité est retrouvée au niveau du colon (Viola and Boeckxstaens, 2020; Nagashima *et al.*, 1996). D'une manière générale, les macrophages situés au niveau de la barrière épithéliale ont un rôle de surveillance du tissu. Une sous-population particulière de macrophages résidents est localisée dans la muqueuse musculuse, proche du système nerveux entérique. Ces macrophages participent au péristaltisme intestinal (contraction musculaire) en étroite interaction avec les cellules musculaires et les neurones entériques environnants (Muller *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2018). Ils sont également impliqués dans le support et la protection de neurones entériques (Gabanyi *et al.*, 2016). Les macrophages situés au niveau de la *lamina propria* jouent un rôle crucial dans la défense de l'organisme face aux pathogènes (Malvin *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2011; Bain *et al.*, 2013).

Tissu adipeux

Chez le petit mammifère, le tissu adipeux est constitué d'une population hétérogène de macrophages. D'une part des macrophages embryonnaires originaires du sac vitellin qui sont capables de proliférer, d'autre part des macrophages dérivés des monocytes qui sont continuellement remplacés (Cox and Geissmann, 2020). Par ailleurs, ces macrophages résidents peuvent également provenir de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques originaires du tissu adipeux (Han *et al.*, 2010; Poglio *et al.*, 2012). Ces macrophages, au profil résolutif M2, jouent un rôle dans la régulation du métabolisme (Cox and Geissmann, 2020). Ils sont capables d'absorber et de stocker les lipides libérés par les adipocytes (Kosteli *et al.*, 2010; Jaitin *et al.*, 2019).

Outre les fonctions classiques décrites pour les macrophages, à savoir le maintien de l'homéostasie tissulaire, la défense de l'organisme face à un danger et leur implication dans la réparation tissulaire, les macrophages résidents présentent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles spécifiques de l'environnement dans lequel ils sont localisés. Leur grande hétérogénéité souligne leur capacité à s'adapter à leur environnement. Ces macrophages sont notamment définis comme les cellules les plus « plastiques » du système immunitaire inné en raison de leur capacité à s'adapter à leur environnement, aussi bien dans une condition d'homéostasie qu'en condition inflammatoire (Figure 15) (Wynn *et al.*, 2013).

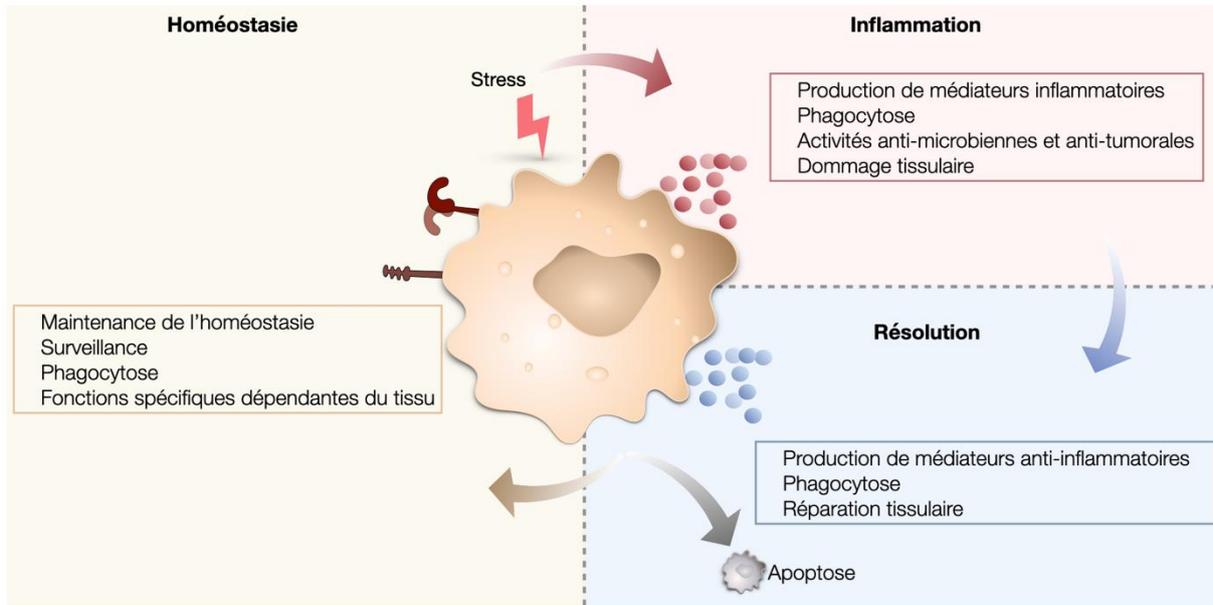


Figure 15. Plasticité des macrophages résidents. s

Les macrophages résidant dans les tissus ont un rôle crucial de maintenance de l'homéostasie tissulaire. Ils ont pour cela des fonctions spécifiques en fonction du tissu dans lequel ils sont localisés. Lors d'un stress, les macrophages résidents sont capables de détecter les signaux de dangers (DAMPs, PAMPs) et adaptent leur activité en conséquence. Ils initient l'inflammation en produisant des médiateurs inflammatoires et effectuent la phagocytose. Ils ont un rôle pivot dans la résolution de l'inflammation en changeant de profil phénotypique et en adaptant leurs fonctions, comme la production de médiateurs anti-inflammatoires.

2. Hétérogénéité fonctionnelle

Dichotomie M1- M2

Les macrophages interviennent tout au long de la réaction inflammatoire et sont capables, en fonction du microenvironnement, d'acquérir un phénotype et des fonctions effectrices différentes. Cette plasticité phénotypique et fonctionnelle leur permet de s'adapter aux variations du micro-environnement.

C'est en 2000, que la classification binaire (M1 et M2) des macrophages a été suggérée. Cette caractérisation est basée sur une étude *in vitro* dans laquelle les macrophages présentent des caractéristiques fonctionnelles différentes en fonction du stimulus. Les macrophages peuvent être classiquement activés « M1 » par l'action de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , le TNF- α ou encore le LPS, tandis qu'une activation par des médiateurs anti-inflammatoires, tels que les interleukines IL-13 et IL-4, induit un phénotype alternatif « M2 » des macrophages (Mills *et al.*, 2000; Yunna *et al.*, 2020).

Les macrophages polarisés M1 libèrent un panel de médiateurs stimulant l'inflammation, tels que l'IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , CXCL10. Ils expriment à leur surface des récepteurs spécifiques comme TLR-2, TLR-4, CD86, participant à la reconnaissance des motifs exprimés par les pathogènes, ou les DAMPs. L'ensemble de ces caractéristiques confère aux macrophages un haut potentiel inflammatoire, associé à des activités antimicrobiennes et anti-tumorales. En effet, ils sont capables d'effectuer la phagocytose, de libérer de l'oxyde nitrique et des ROS impactant l'activité des pathogènes. Ils participent également à l'activation des lymphocytes Th1 (Italiani and Boraschi, 2014; Martinez and Gordon, 2014; Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Palmieri *et al.*, 2020). Ainsi, l'activité de ces macrophages de type M1 permet d'entretenir la réponse inflammatoire.

A l'inverse, les macrophages polarisés M2 sont définis comme des macrophages résolutifs favorisant la réparation tissulaire. Ils sont notamment caractérisés par la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires, tels que l'IL-10, CCL22, TGF- β , et par une forte capacité à effectuer la phagocytose. Ces différents états fonctionnels sont associés à une surexpression de marqueurs membranaires spécifiques comme CD206, CD36, CD163 par exemple (Mantovani *et al.*, 2004; Sica and Mantovani, 2012) (Figure 16).

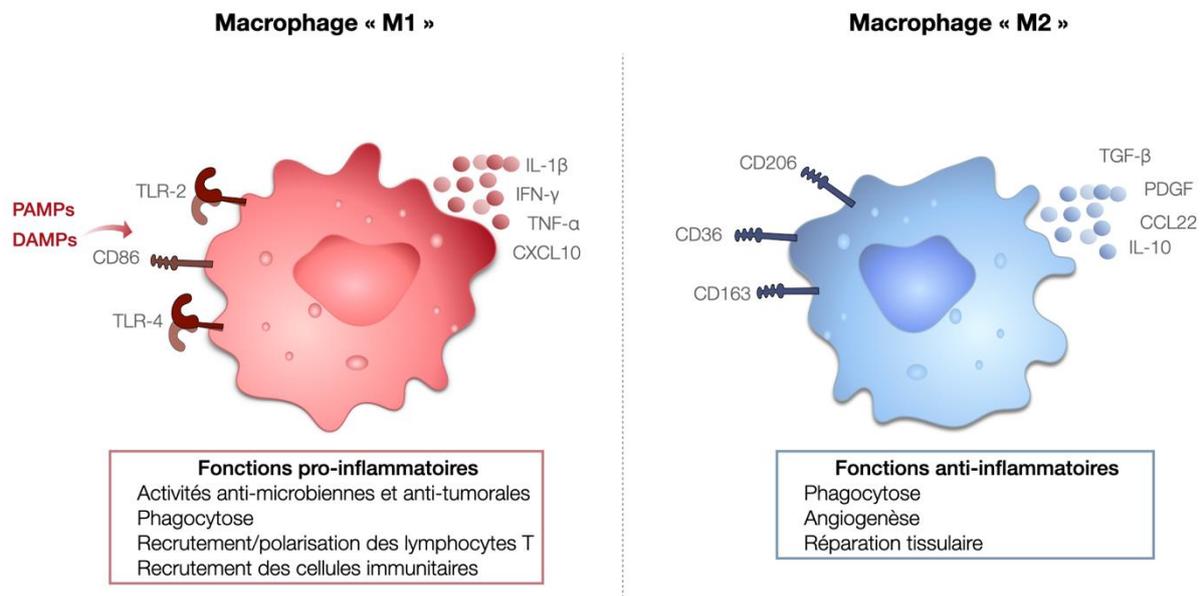


Figure 16. Illustration des propriétés fonctionnelles des macrophages M1 et M2.

La vision classique de la polarisation des macrophages est basée sur la dichotomie M1/M2. Les macrophages inflammatoires M1 sont activés à la suite de la reconnaissance de PAMPs ou de DAMPs. Ils produisent alors un panel de médiateurs de l'inflammation et sont caractérisés par des fonctions inflammatoires. Les macrophages polarisés M2 présentent un phénotype réparateur caractérisé par des fonctions favorisant la réparation tissulaire et par la sécrétion de médiateurs anti-inflammatoires.

Dynamique des macrophages M1 et M2

Pour rappel, quelle que soit l'origine des macrophages (résidents ou dérivés des monocytes), la phase inflammatoire est associée à la présence de macrophages de phénotype pro-inflammatoires (de type M1). Cette polarisation M1 leur confère des propriétés sécrétoires et fonctionnelles pro-inflammatoires : libération de cytokines, chimiokines, une activité de phagocytose et d'efférocytose importante. Nous avons vu que l'efférocytose permet un changement phénotypique des macrophages qui passent d'un profil M1 à un profil M2. Par conséquent, la population des macrophages pro-inflammatoires diminue au profit des macrophages M2 (Figure 17).

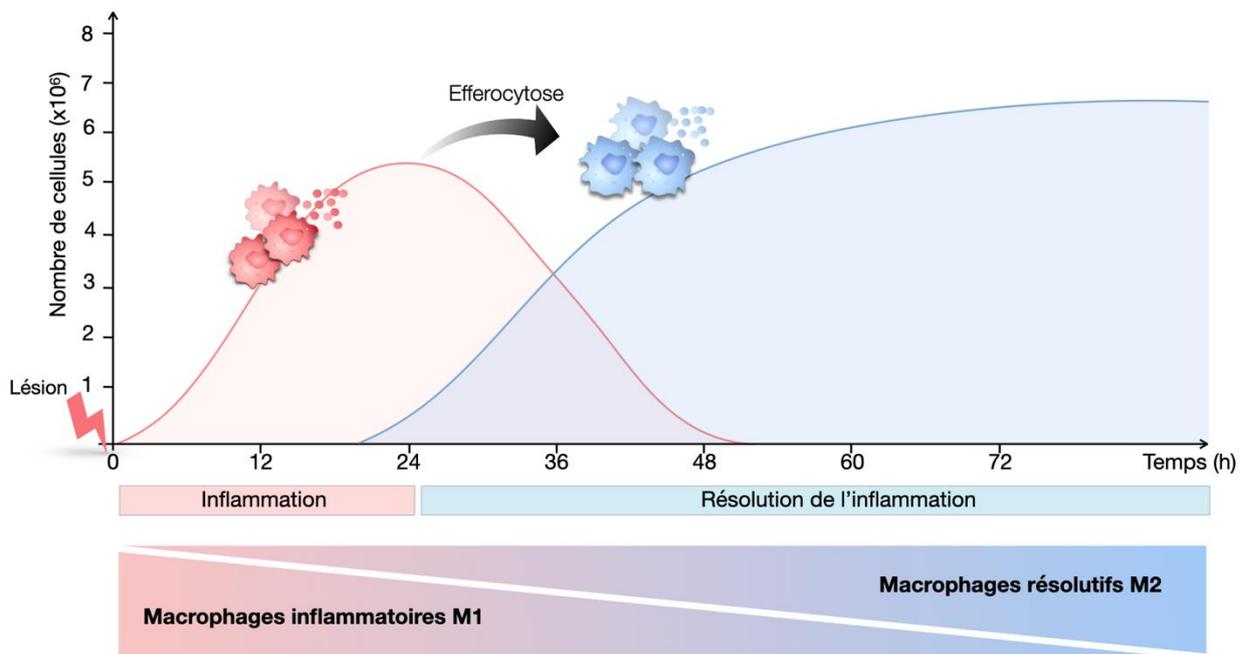


Figure 17. Dynamique des macrophages M1 et M2.

A la suite d'un signal de danger, les macrophages se polarisent en macrophages inflammatoires M1 et initient la réponse inflammatoire en libérant un panel de médiateurs inflammatoires. La population des macrophages M1 augmente progressivement jusqu'à la fin de la phase inflammatoire aiguë (autour de la 24^{ème} heure après l'initiation). Les macrophages M1 effectuent l'efférocytose, favorisant leur changement de phénotype en macrophages résolutifs M2. La population des M1 décroît au profit d'une augmentation de la population des M2.

Élargissement de la classification

Cette configuration binaire, M1 et M2, est en réalité une représentation extrêmement simplifiée de la complexité des macrophages observée *in vivo*. En 2002, ce dogme M1/M2 est remis en question par Mantovani et ses collègues qui introduisent la notion de *continuum* d'activation. Ils décrivent les phénotypes M1/M2 comme étant les extrêmes d'un *continuum* d'états fonctionnels (Mantovani *et al.*, 2002). En 2004, les mêmes auteurs élargissent cette classification en introduisant 3 sous-types d'activation M2 : les macrophages M2a, M2b et M2c (Mantovani *et al.*, 2004). La caractérisation de cette hétérogénéité phénotypique montre que les macrophages peuvent répondre de manière spécifique à un stimulus. Ces différents phénotypes M2 sont impliqués tout au long du processus de réparation tissulaire, notamment au cours des phases de prolifération cellulaire et de remodelage tissulaire (Krzyszczuk *et al.*, 2018).

Au-delà de cette classification, de nombreux macrophages aux profils phénotypiques et fonctionnels distincts ont été également caractérisés. Cette caractérisation ne repose pas seulement sur leur activité pro- ou anti-inflammatoire, mais également sur leur localisation et/ou sur une fonction spécifique. On peut noter par exemple les « Mhem », ou encore les « Mox/M4 ». Ils sont caractérisés par des activités anti-inflammatoires et sont localisés au niveau des vaisseaux sanguins à la suite d'une hémorragie associée aux plaques d'athérosclérose (Jinnouchi *et al.*, 2020; Eshghjoo *et al.*, 2022). Un autre exemple est les « TAMs » qui sont localisés au niveau des tumeurs et favorisent, entre autres, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (Zhou *et al.*, 2020). Ce large spectre phénotypique et fonctionnel des macrophages démontre la capacité de ces cellules à s'adapter à leur environnement, notamment dans des micro-environnements pathologiques.

B. Les macrophages au cours de la réponse inflammatoire

Au cours de la réponse inflammatoire, nous avons précédemment vu dans la partie I. Chapitre 2 I] C), que le nombre de macrophages augmente progressivement au niveau du foyer inflammatoire. Pour rappel, cette dynamique de recrutement des macrophages sur le site lésé dépend du tissu considéré, du type de lésion et de son intensité.

1. Dynamique des macrophages résidents et circulants

Dans tous les tissus, l'initiation de l'inflammation induit le recrutement massif de monocytes circulants qui infiltrent le tissu lésé et se différencient en macrophages. Cette population de macrophages recrutés excède rapidement le nombre de macrophages résidents (Davies *et al.*, 2013; Hashimoto *et al.*, 2013).

Les macrophages résidents participent à l'initiation de la réponse inflammatoire et au recrutement des leucocytes. Dans les étapes précoces de cette réponse, et dans certains tissus, il semblerait que la population des macrophages résidents soit maintenue. En effet, des études montrent que les macrophages résidents résistent à l'inflammation dans les temps précoces (Newson *et al.*, 2014; Gangwar *et al.*, 2020; Epelman *et al.*, 2014). Cependant, durant la phase inflammatoire aigüe, cette population diminue (Figure 18) (Mu *et al.*, 2021; Guilliams and Svedberg, 2021; Guilliams *et al.*, 2020; Blériot *et al.*, 2020). Par exemple, dans le péritoine, dans un contexte inflammatoire initié par un pathogène, on observe une diminution de la population de macrophages résidents entre le déclenchement de la réaction inflammatoire jusqu'à sa résolution au 3^{ème} jour. A 72 heures après l'initiation de l'inflammation, la population des macrophages résidents représente 1/3 de la population initiale (Newson *et al.*, 2014). C'est également le cas dans d'autres tissus, comme par exemple le poumon (Machiels *et al.*, 2017; Guilliams and Svedberg, 2021). Cette diminution de la population des macrophages résidents est due à leur entrée en apoptose. Ginhoux et ses collaborateurs émettent l'hypothèse selon laquelle l'apoptose des macrophages résidents observée au cours de l'initiation de la réponse inflammatoire serait bénéfique pour, d'une part amplifier le processus de recrutement des leucocytes, et d'autre part initier la réponse immunitaire adaptative (Yatim *et al.*, 2015; Ginhoux *et al.*, 2017). Dans la phase de résolution, au-delà du 3^{ème} jour de résolution de l'inflammation, la population des macrophages dérivés des monocytes diminue par apoptose du fait de leur brève durée de vie (Janssen *et al.*, 2011; Patel *et al.*, 2017). En revanche, la population des macrophages résidents tend à augmenter grâce à leur capacité proliférative. C'est notamment le cas dans le cœur où la prolifération des macrophages résidents permet de maintenir la population tissulaire, ou encore dans le pancréas (Epelman *et al.*, 2014; Van Gassen *et al.*, 2015). Outre le mécanisme de prolifération, cette augmentation de la population des macrophages résidents est également due au recrutement des macrophages dérivés des monocytes qui vont alors rester dans le tissu et acquérir, avec le temps, les caractéristiques phénotypiques des macrophages résidents (Guilliams and Svedberg, 2021; Blériot *et al.*, 2020)(Aegerter *et al.*, 2020; Misharin *et al.*, 2017).

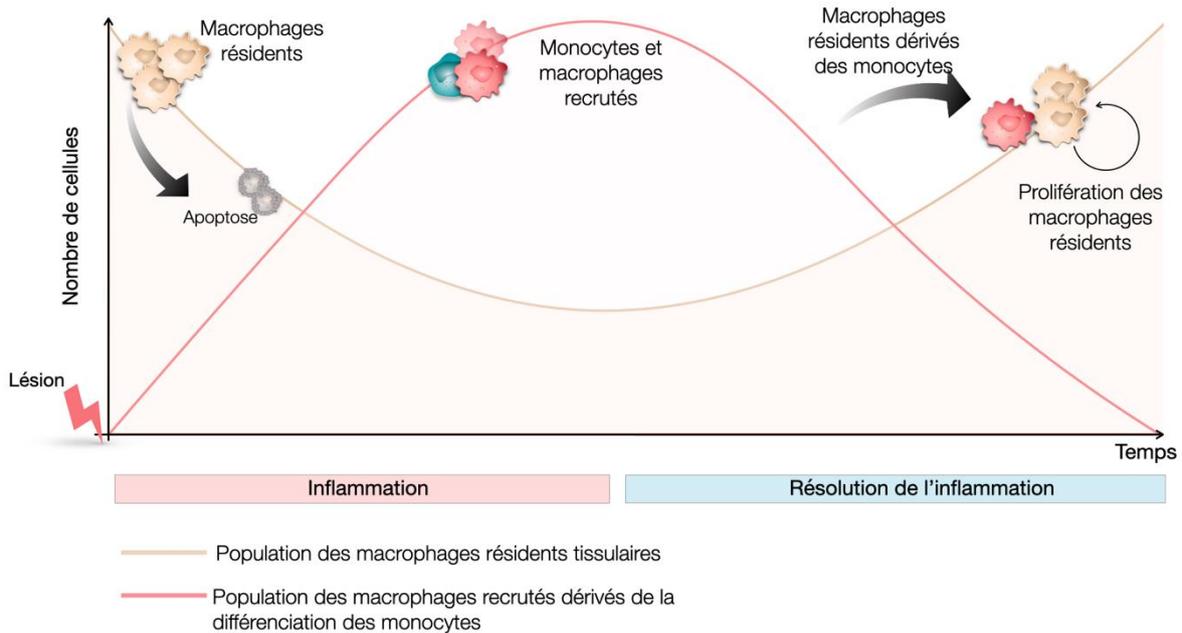


Figure 18. Population des macrophages résidents au cours de la réponse inflammatoire.

A l'initiation de la réponse inflammatoire, la population des macrophages résidents se maintient et participe au recrutement actif des macrophages dérivés des monocytes. Au cours de la phase inflammatoire, la population des macrophages résidents tend à diminuer. Pendant la phase de résolution, ils ont, en fonction du tissu, la capacité de proliférer afin de rétablir leur nombre initial. Les macrophages issus de la différenciation des monocytes participent également à la reconstitution de la population des macrophages résidents. Cette illustration est inspirée de Mu, X. et ses collaborateurs, (2021) « Tissue-resident macrophages in the control of infection and resolution of inflammation », Shock.

2. Rôle des populations de macrophages au cours de l'inflammation

Parmi les premières recherches, Leibovitch et Ross ont pu mettre en évidence, en 1975, l'importance de ces cellules dans la réparation tissulaire chez le mammifère. En effet, après déplétion des macrophages dans un modèle de cochon d'inde, ils constatent une altération du processus de réparation du tissu cutané (Leibovich and Ross, 1975). Dans un contexte de lésion du myocarde, une inhibition de l'infiltration des macrophages altère la clairance du tissu, le dépôt de collagène, et la néovascularisation. Ces observations sont accompagnées d'une mortalité accrue du petit mammifère (van Amerongen *et al.*, 2007). Un travail plus récent, portant sur la déplétion des macrophages du tissu cutané, met en évidence le rôle clé des macrophages tout au long du mécanisme de réparation tissulaire. La déplétion à un temps précoce (au cours de la phase inflammatoire) impacte la formation du tissu de granulation et conduit à la formation d'une cicatrice minime. En revanche, la déplétion des macrophages au

cours de la phase de prolifération cellulaire induit une hémorragie. Enfin, la déplétion plus tardive, lors de la phase de maturation du tissu, n'a pas d'impact significatif sur la formation de la cicatrice (Lucas *et al.*, 2010). Dans le cas d'une lésion hépatique, la déplétion des macrophages durant la phase précoce de réparation est associée à une altération de la formation de la matrice extracellulaire. En revanche, la déplétion durant la phase de remodelage tissulaire est associée à une altération de la dégradation de la matrice extracellulaire et une réparation moins efficace, favorisant ainsi l'apparition d'une fibrose hépatique (Duffield *et al.*, 2005; Ramachandran *et al.*, 2012). Ces études soulignent le rôle crucial et la diversité fonctionnelle des macrophages tout au long de la réparation tissulaire.

Les macrophages jouent également un rôle clé dans l'apparition de certaines pathologies, comme l'apparition des plaies chroniques. Par exemple dans les plaies diabétiques, il est démontré que les macrophages ne parviennent pas à effectuer la phagocytose (Khanna *et al.*, 2010). Ce dysfonctionnement conduit à une accumulation de débris et de signaux pro-inflammatoires sur le site lésé. L'environnement hyperglycémique induit des changements épigénétiques dans les macrophages et bloquent leur transition d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype résolutif (Louiselle *et al.*, 2021; Basu Mallik *et al.*, 2018). Ces dysfonctionnements maintiennent le foyer inflammatoire, à l'origine d'une mauvaise réparation tissulaire.

Il est bien admis dans la littérature que les macrophages résidents et ceux dérivés des monocytes ont des rôles distincts tout au long de la réparation tissulaire, notamment durant la phase inflammatoire (Watanabe *et al.*, 2019). En effet, la déplétion des macrophages dérivés des monocytes dans le myocarde après un infarctus montre une amélioration de la formation de la cicatrice avec une diminution du remodelage (Panizzi *et al.*, 2010). En revanche, une déplétion des macrophages résidents entraîne une altération des fonctions cardiaques et un mauvais remodelage tissulaire avec l'apparition d'une fibrose (Dick *et al.*, 2019; Deniset *et al.*, 2019). Dans les poumons, au cours de maladies inflammatoires, la déplétion des macrophages alvéolaires résidents conduit à une augmentation de la mortalité du petit mammifère, une augmentation du recrutement des neutrophiles, accompagné d'une diminution de la clairance du tissu (Broug-Holub *et al.*, 1997; Beck-Schimmer *et al.*, 2005). Il est également constaté un niveau inflammatoire plus important, suggérant un rôle clé de la régulation de la réponse inflammatoire par les macrophages résidents *via* la production de médiateurs anti-inflammatoires (Knapp *et al.*, 2003). Après une lésion aigüe du pancréas, les macrophages résidents ont un profil plutôt réparateur M2, ils favorisent la prolifération des cellules

pancréatiques lésées et la réparation tissulaire (Van Gassen *et al.*, 2015). Plusieurs travaux montrent que les macrophages résidents présentent une activité d'efférocytose (et de phagocytose) plus efficace que les macrophages dérivés des monocytes circulants (Newson *et al.*, 2014; Epelman *et al.*, 2014; Rabiller *et al.*, 2021; Broug-Holub *et al.*, 1997).

Ainsi, bien que les macrophages partagent des similitudes, il semblerait que ces deux populations de macrophages, aux origines distinctes, aient des rôles différents au cours de la réponse inflammatoire (Mu *et al.*, 2021).

3. Macrophages et vieillissement

Dans le contexte du vieillissement, les macrophages subissent des modifications phénotypiques et transcriptionnelles qui affectent leurs capacités à effectuer la phagocytose, à réparer les tissus, ou à se polariser en réponse à des stimuli (Linehan and Fitzgerald, 2015; Esfahani *et al.*, 2021). Ils sont également caractérisés par une altération de l'autophagie (mécanisme physiologique de « recyclage » des constituants cellulaires), une accumulation de stress du réticulum endoplasmique (organite permettant la production de protéines), ou encore une dysfonction mitochondriale. Ces altérations font notamment partie des 14 marqueurs caractéristiques du vieillissement qui ont été présentés dans le premier chapitre de ce manuscrit (Schmauck-Medina *et al.*, 2022; Yue *et al.*, 2021; van Beek *et al.*, 2019).

La population des macrophages au sein des tissus semble être maintenue avec l'âge, bien que leur capacité de prolifération semble diminuer. Cette observation suggère que le vieillissement s'accompagne d'une augmentation du nombre de macrophages dérivés des monocytes dans les tissus afin de maintenir la population des macrophages (Gentek *et al.*, 2014). Par ailleurs, dans un contexte de réparation tissulaire cutanée chez le petit animal âgé, le nombre de macrophages sur le site lésé est diminué et est associé à une altération des capacités de prolifération des macrophages et à une réponse inflammatoire augmentée. Ces altérations conduisent à une altération de la réparation tissulaire (Dube *et al.*, 2022).

Ces modifications sont corrélées avec l'apparition de l'*inflammaging* chez la personne âgée. On peut donc proposer que l'inflammation chronique du sujet âgé soit due, au moins en partie, aux modifications de fonctionnalité des macrophages. En accord avec cette hypothèse, il est proposé que l'accumulation des altérations de la fonctionnalité des macrophages avec l'âge (autophagie, dysfonction mitochondriale...) participe à l'apparition d'un profil sécrétoire pro-inflammatoire des macrophages. Ces macrophages, caractéristiques du vieillissement,

s'accumulent dans les tissus et participent ainsi à l'inflammation chronique de bas grade (van Beek *et al.*, 2019). De plus, ces altérations de la fonction des macrophages ont un impact sur la résolution du processus inflammatoire au cours de la réparation tissulaire ce qui pourrait participer à l'apparition de l'inflammation chronique (Figure 19). Ainsi, l'apparition de l'inflammation chronique pourrait être associée à cette mauvaise résolution au cours de laquelle les macrophages ne parviennent pas à basculer d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype résolutif.

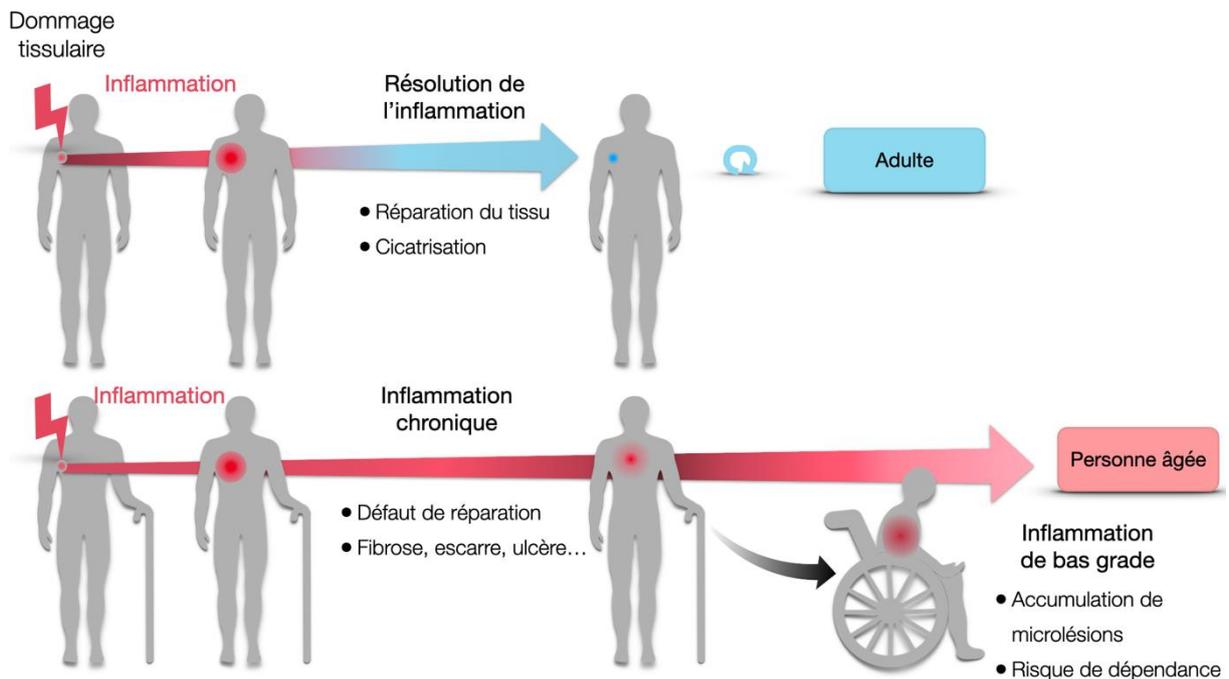


Figure 19. Apparition de l'inflammation chronique au cours du vieillissement.

A la suite d'une lésion chez l'adulte, le processus de réparation tissulaire conduit à la formation d'une cicatrice permettant le retour à une stabilité architecturale du tissu. Cependant, chez la personne âgée il est constaté un défaut de réparation tissulaire associé à une accumulation de microlésions qui conduisent à une persistance de la réponse inflammatoire. Cette dernière pourrait participer à l'inflammation chronique qui est constatée chez la personne âgée.

Chapitre 3. Modélisation *in silico* en biologie

« Tous les modèles sont faux, mais certains sont utiles »

George Box (1919-2013)

I. La modélisation *in silico*, un outil complémentaire pour l'étude de phénomène biologique complexe

A. La modélisation, quelques généralités

1. Définition de la modélisation

La modélisation est définie comme « la présentation d'un phénomène complexe sous forme de modèle formel » (dictionnaire *Le Robert*). En d'autres termes, la modélisation est le fait de concevoir un modèle représentant une version, parfois simplifiée, d'un phénomène complexe à étudier. Ce modèle va pouvoir être utilisé pour tester des hypothèses conformes aux observations réelles du phénomène et ainsi de prédire son comportement.

En sciences, la modélisation est utilisée dans toutes les disciplines. En écologie, elle est, par exemple, utilisée pour évaluer l'impact de l'abattage et des conditions climatiques sur l'extinction des populations marines (Davis, 2022). En économie, la modélisation peut servir à prédire la croissance économique de 147 pays d'ici 2050 (Fouré *et al.*, 2013). En physique, les modèles prédictifs peuvent, par exemple, servir à étudier des phénomènes de propagation de dommages dans les moteurs à turbine à gaz des avions (Saxena *et al.*, 2008). En biologie, la modélisation *in silico* peut servir à explorer et expliquer des interactions entre les macrophages et les cellules cancéreuses dans un modèle d'étude *in vitro* (Li *et al.*, 2019).

Au vu de cette diversité d'application, le concept de modèle est polysémique et il n'existe, en réalité, pas de définition unique. Quelle que soit la discipline impliquée et la définition du terme « modèle » qui lui est associée, il convient de dire qu'un modèle est une « représentation » simplifiée, se substituant au réel qui peut être difficile, inaccessible, ou bien trop complexe à utiliser à des fins expérimentales.

2. Pourquoi faire un modèle *in silico* ?

Le concept de modèle prend un sens large comme nous venons de l'évoquer dans la définition de la partie précédente. Dans ce manuscrit, nous nous intéressons plus particulièrement à la modélisation *in silico* appliquée à la compréhension d'un système biologique.

La modélisation *in silico*, qui traite des données numériques par des moyens informatiques, possède plusieurs bénéfices. Comme défini précédemment, un modèle permet de substituer le

réel, de le décrire de façon synthétique en mettant en relation les différentes variables d'intérêt qui peuvent être difficilement accessibles à l'expérience pour diverses raisons. La création d'un modèle *in silico* pousse à une réflexion particulière pour permettre la simplification d'un phénomène réel afin de répondre à une problématique précise. Le paradigme pour le modélisateur est de concevoir un modèle le plus simplifié possible et à la fois le plus représentatif du phénomène observé. Ce niveau d'abstraction va dépendre de la question biologique et des choix effectués par le modélisateur. Comme l'a défini James Black :

« le but des modèles n'est pas d'être une description pathétique de la nature ; ils sont au contraire des descriptions de notre pensée pathétique de la nature » (Black, 1988).

La description du modèle repose sur un ensemble d'hypothèses relatives qui permettent de reproduire le comportement du phénomène réel à étudier. Ces hypothèses se basent sur les connaissances *a priori* et *a posteriori* et s'établissent par l'utilisation de relations mathématiques, de règles ou encore de symboles, entre les différentes variables, ou entités, du modèle. Une des étapes cruciales de ce processus de modélisation est l'identification de ces relations et des paramètres clés du modèle permettant de répondre à une problématique définie. En effet, l'utilisation de modèle *in silico* permet de répondre à une question posée, tester des hypothèses, prédire le comportement du modèle, aider à l'explication d'un phénomène observé dans le réel et à concevoir de nouvelles expériences. En général, un seul modèle ne permet pas de remplir toutes ces fonctions. Le choix du modèle ainsi que le niveau de simplification vont ainsi dépendre des intentions de l'expérimentateur, du seuil à partir duquel l'abstraction effectuée est suffisamment acceptable pour répondre aux objectifs définis.

Un de ces apports à la science, et pas des moindres, est sa capacité à prédire et donc à anticiper le comportement d'un modèle. Nous détaillerons par la suite les apports ainsi que les limites de ces modèles *in silico* dans l'étude de mécanismes biologiques.

B. Les apports et les limites de la modélisation *in silico* en biologie

1. Apports des modèles *in silico* par rapport aux modèles *in vivo* et *in vitro*

Outre les modèles *in vitro* (au niveau cellulaire) et *in vivo* (à l'échelle de l'organisme) classiquement utilisés dans les laboratoires de recherche, les modèles *in silico* permettent

d'apporter plusieurs avantages afin d'aider à améliorer la compréhension des systèmes biologiques (Brodland, 2015). En effet, les expérimentations réalisées dans les laboratoires de biologie génèrent des données qui sont obtenues, suivant le protocole d'étude, en quelques heures, quelques mois voire en quelques années. Les moyens mis en œuvre pour établir ces expériences sont parfois lourds, avec des problématiques éthiques, économiques et qui peuvent nécessiter du temps et des moyens humains conséquents. En comparaison, un modèle *in silico* est capable de générer des données simulées en quelques secondes ou quelques heures. Les résultats de ces simulations sont par la suite comparés aux données biologiques afin d'ajuster le modèle ou de cibler les expériences à réaliser dans les laboratoires pour répondre au mieux à la question posée et ainsi diminuer les expériences biologiques. Idéalement, ces modèles *in silico* sont conçus en parallèle des expériences *in vivo* ou *in vitro* afin de les consolider.

Les modèles *in silico* permettent d'intégrer des connaissances *a priori*. En effet, la construction d'un modèle *in silico* nécessite, en premier lieu, des connaissances de l'expérimentateur relatives au phénomène à étudier. Des connaissances *a posteriori*, fondées sur les données obtenues dans les laboratoires, sont par la suite ajoutées permettant de valider le modèle. Par ailleurs, les données, les observations, ou les connaissances intégrées au modèle peuvent être obtenues à différentes échelles biologiques. Cela permet d'intégrer et de synthétiser des données à l'échelle moléculaire jusqu'à l'échelle cellulaire, ou encore de l'organisme entier, afin d'étudier le système dans sa globalité. Ainsi, les modèles *in silico* sont capables de regrouper des données de plusieurs natures afin de pouvoir explorer et tester de nombreuses hypothèses et par conséquent de prédire le comportement du modèle dans différentes conditions.

Tester des hypothèses est plus rapidement réalisable en utilisant un modèle *in silico* comparé à un modèle classique d'étude en biologie basé sur l'expérimentation animale, ou encore cellulaire. En effet, dans ce dernier cas il est souvent nécessaire d'effectuer des mises au point pour tester différentes hypothèses, tout en sachant que le coût est important. Le fait de pouvoir tester de nombreuses hypothèses permet une exploration plus approfondie du phénomène étudié.

Un point également intéressant des modèles *in silico* est la possibilité d'étudier l'effet de la variation d'un seul paramètre sur le phénomène sans influencer les autres paramètres qui composent le modèle. C'est un avantage indéniable par rapport à l'approche expérimentale en laboratoire qui n'offre pas cette possibilité. Il est ainsi possible, et plus aisé, d'évaluer le poids de chaque paramètre du modèle *in silico*.

2. Limites des modèles *in silico*

La modélisation *in silico* permet, comme on vient de l'évoquer, d'apporter plusieurs bénéfices à l'étude de la physiologie. Cependant, comme toute méthode, celle-ci comporte des limites (Figure 20). En effet, par définition un modèle ne permet pas de représenter dans sa totalité et de façon fidèle, un phénomène observé dans toute sa complexité. Cela est d'autant plus vrai pour l'étude de la physiologie du fait des nombreuses interactions biologiques qui existent et qui sont difficiles à modéliser, ce qui pourrait constituer une limite. Cependant, la question biologique posée permet de définir un niveau d'abstraction acceptable du modèle (Netz and Eaton, 2021; Bray, 2015). La validation de celui-ci passe par la reconstitution du phénomène réel, en comparant les données simulées avec les observations et les données biologiques. D'après Jeremy Gunawardena :

« si le modèle est correct et que nous croyons ses hypothèses, nous devons, en toute logique, croire ses conclusions » (Gunawardena, 2014).

Par ailleurs, il faut prendre en compte la quantité de données biologiques mises à disposition pour la construction du modèle. Bien que la construction du modèle pourrait ne reposer que sur des connaissances théoriques, la robustesse tient en partie aux données qui participent à sa validation. Ainsi, en fonction du type de modèle utilisé (que nous développerons dans les parties suivantes), les données doivent être plus ou moins abondantes.

Ces modèles *in silico* semblent apporter de nombreux avantages à l'étude des phénomènes biologiques. Cependant, ils ne pourront pas remplacer les expériences pour démontrer un mécanisme biologique. Il faudra auparavant le confirmer à l'aide des modèles *in vitro* ou *in vivo*. En revanche, ils peuvent orienter et proposer de nouveaux mécanismes décrivant le phénomène étudié. Par conséquent, les modèles *in silico* doivent être considérés comme un outil complémentaire d'étude de mécanisme biologique complexe.

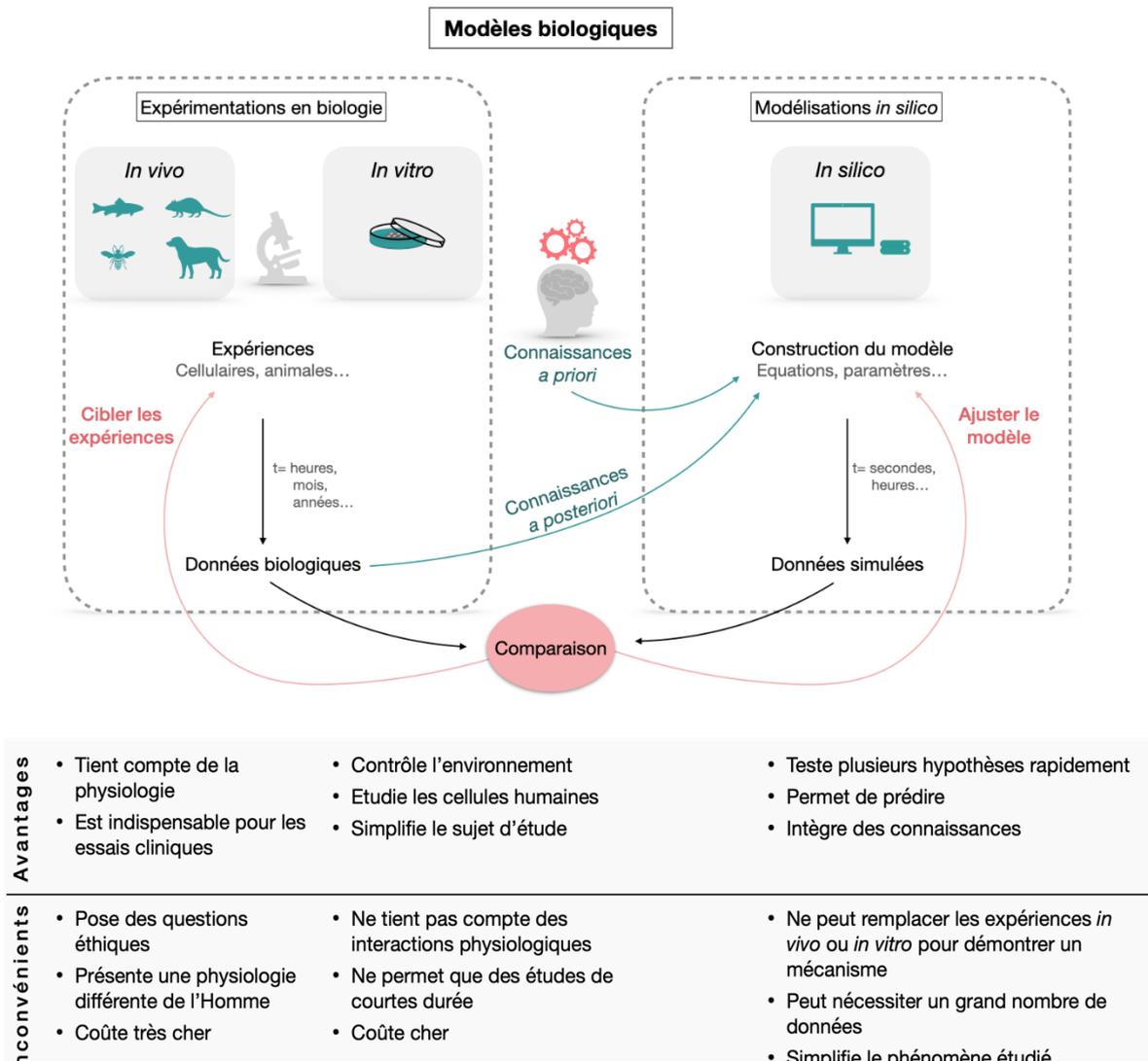


Figure 20. Comparaison des différentes approches de modélisation en biologie.

Plusieurs modèles sont utilisés en biologie. D'une part, on trouve les modèles *in vivo* et *in vitro* couramment utilisés dans les laboratoires pour réaliser des expériences sur des modèles du vivant. D'autre part, les modèles *in silico* qui ne font pas appel au vivant. Ces différentes approches comportent des avantages et des inconvénients. Les modèles *in silico* peuvent être vus comme des outils complémentaires à l'étude des phénomènes biologiques complexes.

C. Modélisation des systèmes biologiques

1. La modélisation *in silico* dirigée par les théories

La modélisation *in silico* en biologie permet d'associer les mathématiques et l'informatique dans le but de répondre à une problématique sur un phénomène réel, avec la volonté de tenir compte de l'aspect multi-échelle des systèmes biologiques. Schématiquement, la modélisation *in silico* peut être divisée en deux catégories : les modèles dirigés par les théories, sur la base des connaissances *a priori*, et les modèles dirigés par les données (Figure 21) (Chen and Rossi, 1983; Eisenhardt, 1989; Kitano, 2002; Kitchin, 2014; Maass et al., 2018).

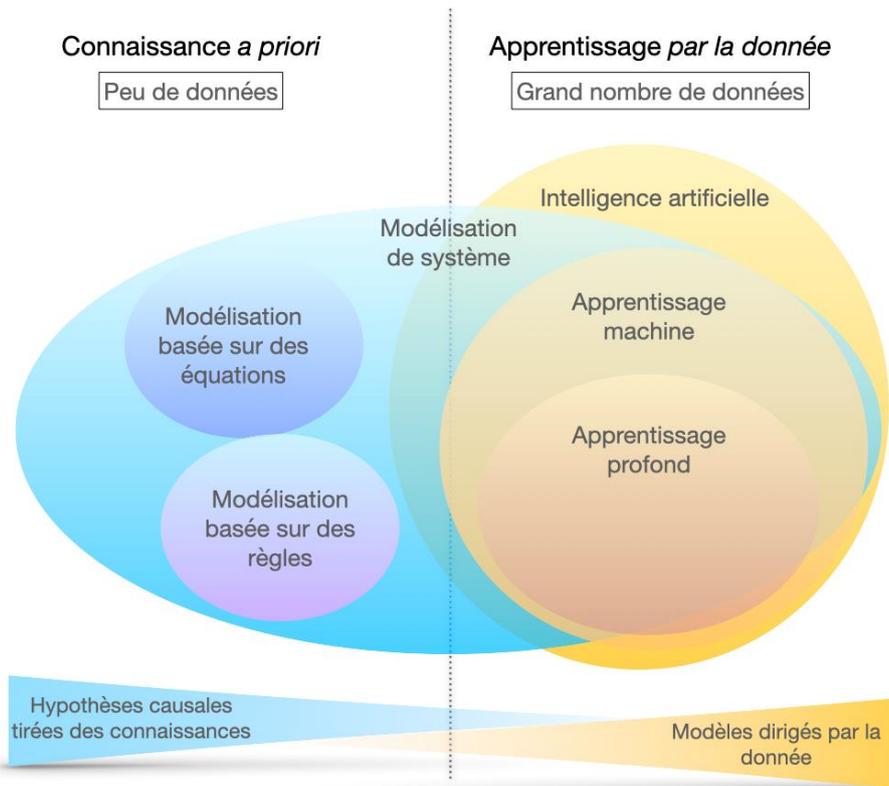


Figure 21. Proposition d'une classification des approches de modélisation dans le domaine du traitement de la donnée.

Cette proposition de catégorisation se base sur deux stratégies de modélisation. D'une part, l'apprentissage *a priori* nécessitant peu de données et établi sur des hypothèses basées sur les connaissances du phénomène à étudier. D'autre part, l'apprentissage dirigé par la donnée qui nécessite un nombre de données relativement important.

Dans la catégorie de l'apprentissage *a priori* on trouve des modèles capables d'utiliser peu, voire aucune donnée biologique. Ces modèles sont constitués à partir d'hypothèses causales tirées des connaissances *a priori* et des observations biologiques. Parmi ces modèles dirigés par la connaissance, certains sont basés sur des équations mathématiques ou des règles. Par exemple, on peut classer dans cette catégorie les modèles mathématiques basés sur les équations différentielles. Le développement de ces modèles nécessite des connaissances *a priori* afin d'établir des hypothèses quant à l'évolution des entités modélisées au cours du temps. En fonction du contexte posé, ces modèles peuvent être théoriques et ne pas nécessiter de données quantitatives.

Par opposition, on trouve le large domaine de l'intelligence artificielle qui nécessite un grand nombre de données pour être exploité et apporter des résultats robustes. On retrouve notamment dans cette catégorie l'apprentissage machine ou encore l'apprentissage profond. Ces modèles vont être dirigés par la donnée, c'est-à-dire qu'ils ne nécessitent pas l'établissement d'hypothèses basées sur des connaissances d'expertise.

Dans la suite de ce manuscrit nous nous sommes focalisés sur les modèles *in silico* construits à partir des connaissances *a priori* et des données biologiques en faible quantité.

2. Utilisation de la modélisation *in silico* en biologie

La modélisation *in silico* des systèmes biologiques est un domaine de recherche en plein essor comme en témoigne le nombre grandissant d'études scientifiques publiées (Figure 22 (A)). Malgré l'augmentation générale du nombre de publications, la modélisation *in silico* gagne en intérêt (Figure 22 (B)). Ces publications sont répertoriées dans PubMed, une base de données bibliographiques de la biologie et de la médecine. Par ailleurs, le développement des nouvelles techniques biologiques générant de grandes bases de données (protéomique, métabolomique, « *single-cell RNA sequencing* » ...) a notamment favorisé le développement d'outils informatiques et des approches *in silico* permettant une meilleure analyse de ces données.

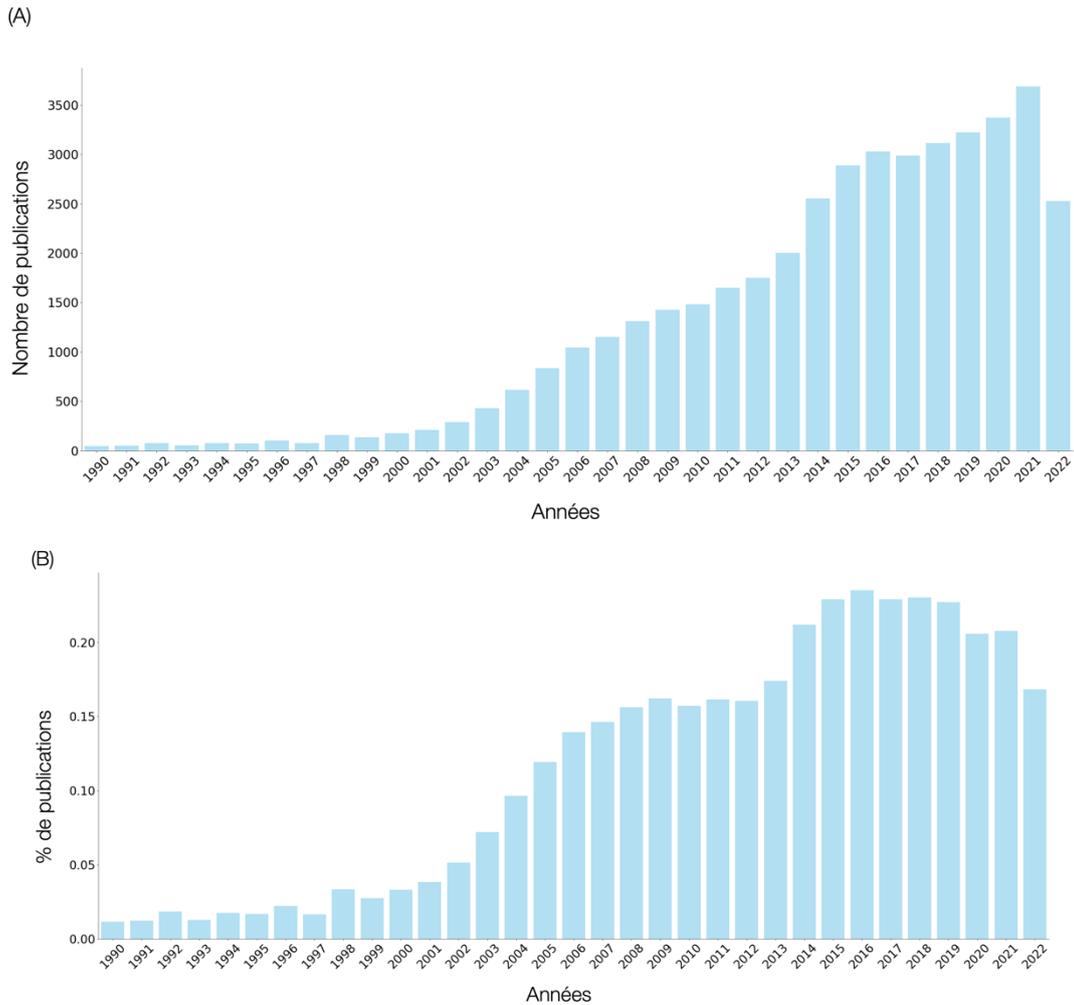


Figure 22. Nombre de publications scientifiques utilisant les approches de modélisation *in silico* de 1990 à 2022.

Cette analyse a été effectuée avec la recherche avancée de la base de données PubMed en utilisant les mots-clés « ((computational) OR (mathematical)) AND (modelling) AND (system biology) ». Les publications allant de 1990 à 2022 ont été relevées (requête PubMed effectuée le 9 novembre 2022). (A) : représentation graphique du nombre de publications scientifiques sur la modélisation *in silico* en biologie par an. (B) : nombre de publications scientifiques sur la modélisation *in silico* en biologie par rapport au nombre total de publications scientifiques répertoriées sur PubMed.

L'analyse bibliométrique, basée sur la co-occurrence des mots-clés, permet une analyse quantitative en réseau de la littérature scientifique utilisant des approches de modélisation *in silico* (Figure 23 (A)). Ce terme de co-occurrence signifie que lorsqu'un ensemble de mots clés apparaît dans différents articles, ou revues scientifiques, les concepts se trouvant derrière ces mots sont alors reliés. La distance entre deux mots-clés (nœuds du réseau) représente leur lien de parenté, du point de vue de leur co-citation (van Eck and Waltman, 2010). Cette analyse

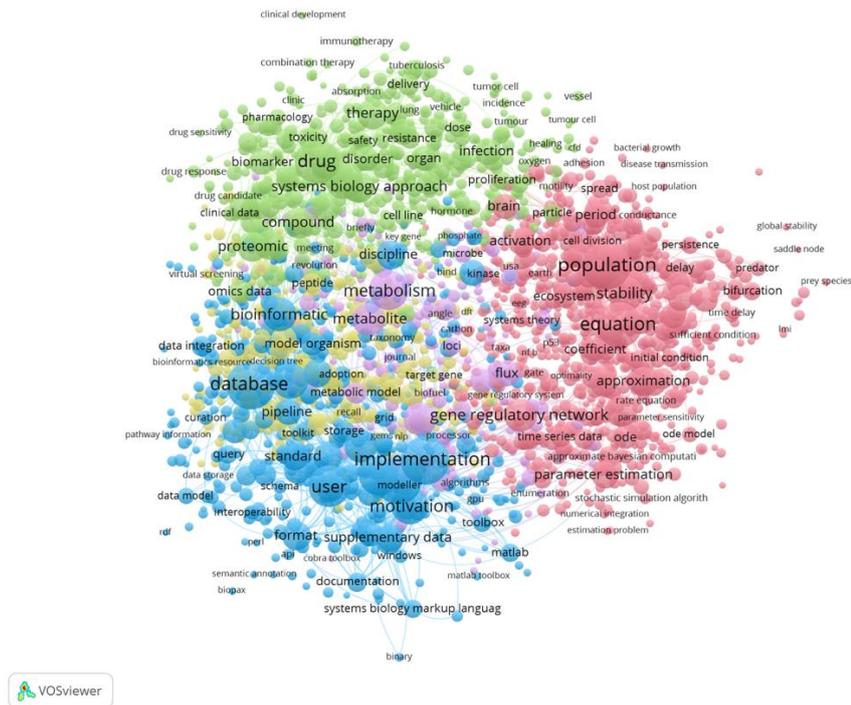
bibliométrique permet de mettre en exergue les domaines d'utilisation de la modélisation *in silico* en biologie. L'étude des systèmes biologiques, génomique et pharmacologique représente les grands domaines dans lesquels des modèles *in silico* ont été utilisés entre 1990 et 2022.

En effet, l'étude de la biologie des systèmes est assez récente, puisqu'elle a été introduite au début des années 2000 (Kitano, 2001). Elle se base sur le principe que la compréhension de la physiologie doit tenir compte de l'organisme entier au lieu d'une seule partie. L'accent est ainsi mis sur la compréhension des structures, des dynamiques d'un système et non seulement restreint à un assemblage de gènes et de protéines qui ne permet pas une compréhension complète du système biologique. Cette approche d'étude systémique implique un grand nombre de données (protéomique, métabolomique, ...) qui depuis ces dernières années ne cesse de croître grâce aux progrès technologiques favorisant l'utilisation des modèles *in silico* dans la découverte et le développement de nouvelles molécules thérapeutiques notamment. Outre la quantité de données, cette approche est également basée sur des hypothèses pour la conception et l'analyse expérimentale multi-échelle (Ideker *et al.*, 2001). Ces avancées technologiques ont également favorisé l'étude à l'échelle cellulaire des voies de régulation des gènes, pour lesquelles de nombreux modèles *in silico* ont été développés afin d'améliorer les connaissances sur les mécanismes de régulation. En pharmacologie, les avancées technologiques ont rendu possible l'étude de traitements, notamment dans la recherche sur le cancer. L'utilisation de modèles computationnels sert d'outil complémentaire au ciblage thérapeutique.

Enfin, si on se focalise sur les productions scientifiques publiées au cours de la dernière année, on peut s'apercevoir que les tendances de recherche utilisant des modèles *in silico* changent (Figure 23 (B)). En effet, l'analyse bibliométrique en réseau permet de mettre en avant que les recherches scientifiques actuelles se focalisent, d'une part sur une thématique d'actualité liée la pandémie de la maladie COVID-19. D'autre part, les productions scientifiques s'orientent sur le domaine du cancer, du système immunitaire, de l'inflammation et des voies de signalisation. Une partie des recherches est également focalisée sur le développement de méthodes computationnelles.

Cette analyse permet de mettre en exergue les différents domaines d'application de la modélisation *in silico*, ainsi que les thématiques de recherche où elle tend à se développer. L'intérêt grandissant porte sur l'étude des systèmes biologiques qui vise à regrouper des données issues de plusieurs échelles biologiques afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques.

A



B

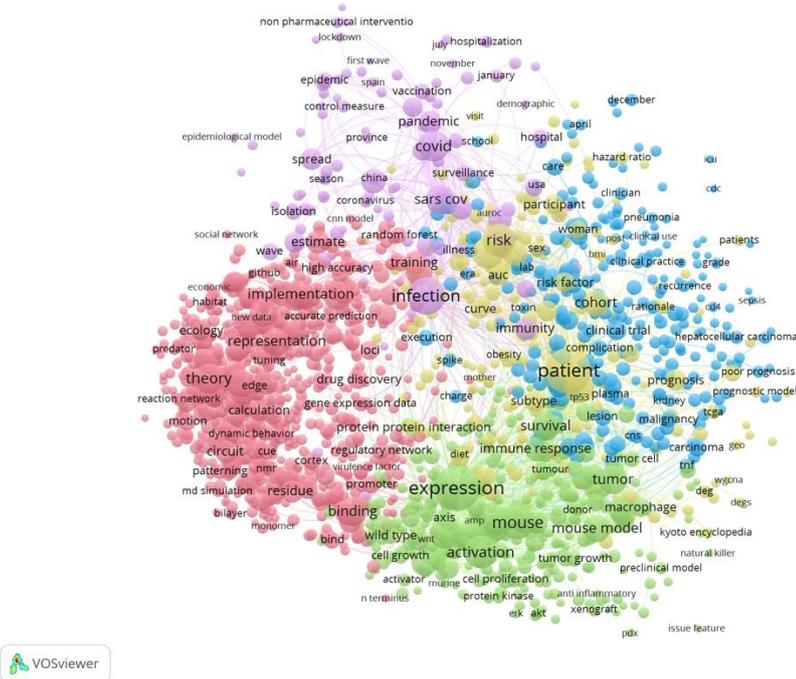


Figure 23. Analyse bibliométrique sur le thème de la modélisation *in silico*.

(A) Analyse en réseau de 2498 termes associés aux résultats de la recherche sur PubMed avec les mots-clés « ((computational) OR (mathematical)) AND (modelling) AND (system biology) » sur la période 1990 à 2022. (B) Analyse en réseau de 1772 termes associés à la même requête PubMed sur les années 2021-2022. Ces analyses en réseau ont été effectuées avec le logiciel VOSviewer (version 1.6.18 ; analyse effectuée le 9 novembre 2022).

II. Les différentes approches de modélisation *in silico* utilisées en biologie

A. Classification des approches

Au cours de ces dernières années, plusieurs approches de modélisation *in silico* ont été utilisées pour l'étude de phénomènes biologiques complexes (Bartocci and Lió, 2016; Fisher and Henzinger, 2007). Parmi les approches les plus couramment rencontrées dans la littérature scientifique, on trouve les modèles basés sur la résolution de systèmes d'équations différentielles, les modèles basés sur les agents, les réseaux de Petri, les réseaux booléens ou encore les réseaux bayésiens. Ces différentes approches seront présentées dans la suite de ce manuscrit.

La classification de ces modèles permettant d'orienter le choix de l'approche peut se faire suivant plusieurs critères. Ces critères dépendent en grande partie de la question biologique posée, des données biologiques accessibles et des connaissances *a priori* du mécanisme à étudier, ainsi que du niveau d'abstraction que le modélisateur souhaite appliquer. Outre ces critères, les modèles *in silico* peuvent être classifiés suivant d'autres caractéristiques. Parmi celles-ci on trouve :

- la capacité à intégrer des **équations ou des règles** : la construction du modèle peut reposer sur des équations mathématiques, comme par exemple des équations différentielles, ou bien sur la base de règles, comme par exemple les réseaux booléens basés sur le concept de « ON/OFF » qui sera détaillé par la suite.
- la notion de reproductibilité des données simulées fondée sur la prise en compte de **paramètres déterministes ou stochastiques**. Les modèles déterministes (réseaux booléens, systèmes différentiels, ...), permettent d'obtenir des résultats identiques à chaque simulation, avec des conditions initiales identiques ne dépendant pas du hasard. Les modèles stochastiques (réseaux bayésiens, chaînes de Markov, réseaux de Petri Stochastiques, ...) permettent d'ajouter des événements aléatoires dans les valeurs d'entrée, aspect intéressant pour intégrer l'incertitude épistémique associée à un manque de connaissance sur la donnée, ou la mesure, ou l'incertitude aléatoire basée sur le caractère incertain des phénomènes modélisés. En sortie de ces modèles, il est ainsi possible de mesurer l'intervalle de confiance sur le résultat obtenu permettant dès lors de faciliter l'interprétation relative à la représentativité de l'information calculée.

- le caractère **continu ou discret** des variables : dans le premier cas les variables peuvent prendre un nombre infini de valeurs sur un intervalle donné (durée associée à une phase de résolution d'un processus biologique par exemple). Dans le second cas, les variables se limitent à quelques valeurs possibles (par exemple des nombres entiers associés au nombre de macrophages impliqués dans la résolution d'une inflammation).
- **les caractéristiques d'échelle** : certaines approches sont plus appropriées pour répondre à une problématique en fonction de l'échelle et des données biologiques associées (à l'échelle de l'organisme). Par exemple, les modèles basés sur les agents sont particulièrement adaptés pour la modélisation *in silico* à l'échelle cellulaire.

On trouve régulièrement dans la littérature une classification de ces modèles en fonction de la méthode de modélisation (Pinu *et al.*, 2019; San León and Nogales, 2022) :

- l'approche **ascendante**, en anglais « *bottom-up* » : ce sont des modèles se concentrant sur la description des phénomènes à une petite échelle, microscopique, par exemple à l'échelle de la cellule. Cette approche requiert des données associées à ce niveau de description. La caractérisation des mécanismes à cette échelle permet de générer un comportement émergent, à une échelle macroscopique, issue de l'interaction entre les différentes variables et paramètres du modèle. Cette approche exige que les interactions entre les variables ainsi que les paramètres du système soient bien caractérisés. Les modèles basés sur des agents, décrits par la suite, reposent sur ce type d'approche.
- l'approche **descendante**, en anglais « *top-down* » ou « *reverse engineering* » : cette approche est basée sur une description du phénomène étudié à une échelle macroscopique, par exemple à l'échelle de la population cellulaire. Des informations à une échelle inférieure pourront être extraites. Les modèles basés sur les systèmes différentiels appartiennent à cette catégorie de techniques.

Le travail de Jessica S. Yu et de Neda Bagheri permet de résumer le nombre de publications utilisant des modèles *in silico* sur la base de données PubMed jusqu'en 2016, montrant ainsi les tendances d'utilisation de ces modèles en fonction de certaines caractéristiques que nous venons de citer, dont l'échelle biologique (Figure 24) (Yu and Bagheri, 2016). Indirectement, ce travail met en exergue que les modèles *in silico* sont principalement utilisés pour des problématiques de dynamique à l'échelle de la protéine, de la cellule ou de la population cellulaire.

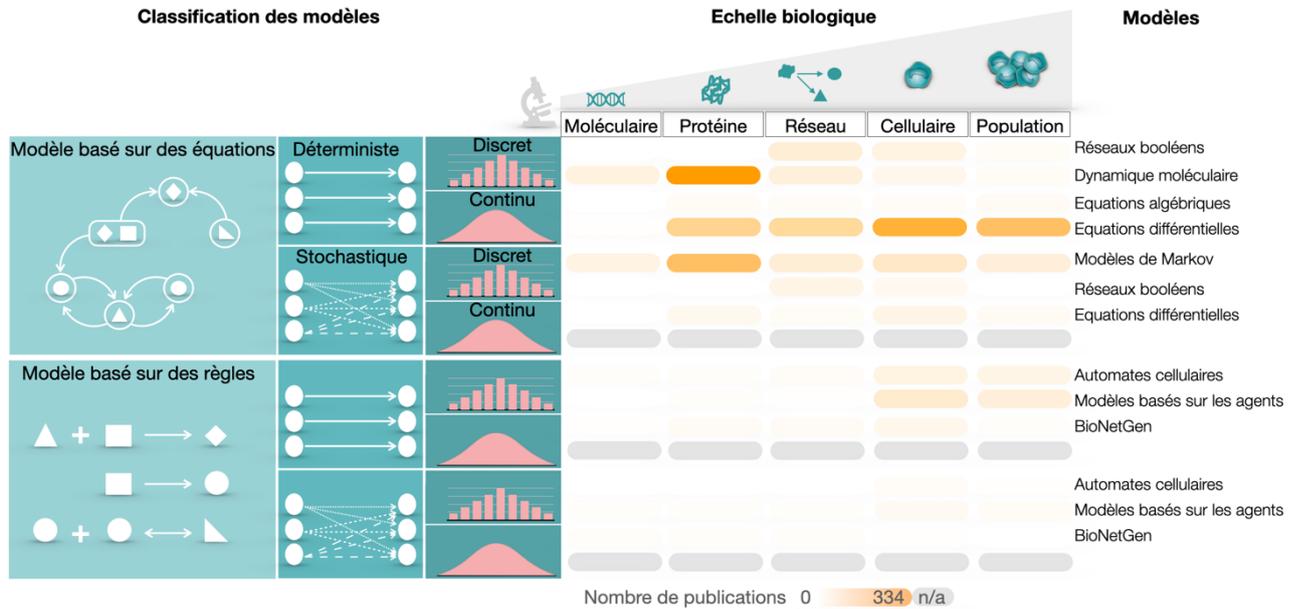


Figure 24. Classification des différentes approches de modélisation *in silico*, en fonction de l'échelle biologique et des caractéristiques des modèles (données sur l'année 2016).

Cette représentation permet de classer les différentes approches de modélisation *in silico* en fonction de plusieurs caractéristiques. Les modèles peuvent être basés sur des équations ou des règles ; déterministes ou stochastiques ; discrets ou continus. L'échelle de couleur représente le nombre d'articles scientifiques publiés dans la base de recherche PubMed. Cette analyse permet de mettre en évidence les tendances (en 2016) de sélection des approches par rapport à l'échelle biologique. Cette illustration est adaptée de Jessica, S. Y., & Bagheri, N. (2016) « Multi-class and multi-scale models of complex biological phenomena », *Current opinion in Biotechnology*.

B. Approches de modélisation *in silico*

Plusieurs approches de modélisation *in silico* ont été développées ces dernières années pour répondre à des problématiques biologiques. Parmi celles-ci, nous introduirons les systèmes basés sur les équations différentielles correspondant à l'approche de modélisation la plus utilisée, comme en témoigne le nombre de publications scientifiques sur la période 1990 – 2022 (Figure 25). Des alternatives de modélisation, comme les systèmes multi-agents, les techniques booléennes, les réseaux de Petri ou les approches bayésiennes seront également brièvement décrites.

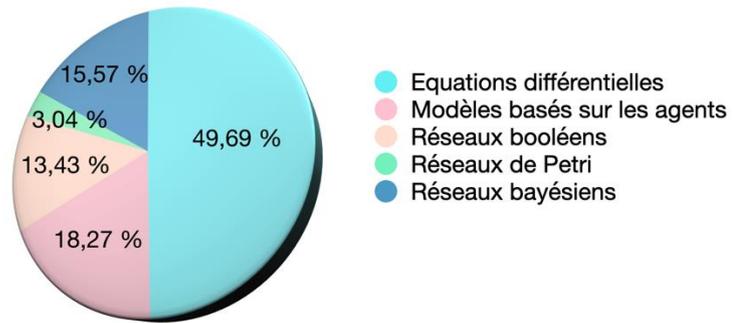


Figure 25. Répartition graphique du nombre de publications entre 1990 et 2022 pour les principales techniques de modélisation utilisées en biologie.

Le nombre de publications a été récolté sur la base de données PubMed en utilisant la recherche avancée incluant les mots-clés « (differential equation) AND (modelling) AND (system biology) » pour les équations différentielles ; « (((agent-based model) OR (individual cell-based model)) AND (modelling) AND (system biology) » pour les modèles basés sur les agents ; « (Boolean network) AND (modelling) AND (system biology) » pour les réseaux booléens ; « (Petri net) AND (modelling) AND (system biology) » pour les réseaux de Petri ; « (bayesian network) AND (modelling) AND (system biology) » pour les réseaux bayésiens (requête PubMed effectuée le 9 novembre 2022).

1. Modèles basés sur des règles

Parmi les modèles basés sur des règles, on trouve notamment les systèmes multi-agents qui ont été développés au cours des années 1970. Ces modèles sont appliqués dans toutes les disciplines scientifiques dès lors que des entités autonomes peuvent être modélisées. Parmi les disciplines, on trouve notamment ces modèles en économie (Tsfatsion, 2006; Wolf *et al.*, 2013), en sciences sociales (Gilbert and Troitzsch, 2005), en écologie (Grosman *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016), ou encore en épidémiologie (Auchincloss and Diez Roux, 2008; Silva *et al.*, 2020). Ces modèles basés sur la notion d'agents, ou individus, ont été largement développés ces dernières années pour l'étude de la dynamique des systèmes biologiques (An *et al.*, 2009). Les modèles basés sur des agents reposent sur la modélisation d'un ensemble d'agents, correspondant à l'entité que l'on cherche à modéliser, qui interagissent de façon autonome avec leur environnement (Figure 26) (Dorri *et al.*, 2018). Ces modèles permettent de reproduire, à une échelle microscopique, le comportement de chaque agent. Les phénomènes qui émergent sur une échelle plus globale, macroscopique, sont issus des interactions entre les agents constituant le système. Ainsi, les phénomènes émergents observés à l'échelle de la population pourront être expliqués par des propriétés à l'échelle individuelle. La force de cette approche

ascendante est que chaque agent répond de façon autonome et indépendante à son environnement en intégrant notamment la notion de spatialité. En effet, un agent évalue individuellement sa situation et prend des décisions sur la base d'un ensemble de règles qui lui auront été assignées (Bonabeau, 2002). Ces caractéristiques confèrent aux systèmes basés sur des agents un intérêt grandissant de la communauté des chercheurs dans le domaine de l'intelligence artificielle distribuée (Ferber and Weiss, 1999; Verbraeken *et al.*, 2021).

La modélisation à base d'agents peut être associée à une approche discrète ou continue. Les règles qui dictent le comportement des agents peuvent être stochastiques ou bien déterministes. La construction de ces modèles s'effectue sur la base des connaissances à l'échelle microscopique sur les interactions connues, ou hypothétiques, entre chaque agent ce qui permet de faire émerger des comportements collectifs. Ces modèles sont constitués de trois éléments (Macal and North, 2014) :

- les agents, leurs attributs (position, vitesse...) et leurs comportements (informations que l'agent perçoit de son environnement jusqu'à la prise de décisions et aux actions qui en découlent) ;
- les relations entre agents et les méthodes d'interaction précisant comment et avec qui ils interagissent ;
- l'environnement des agents et leurs modes d'interaction.

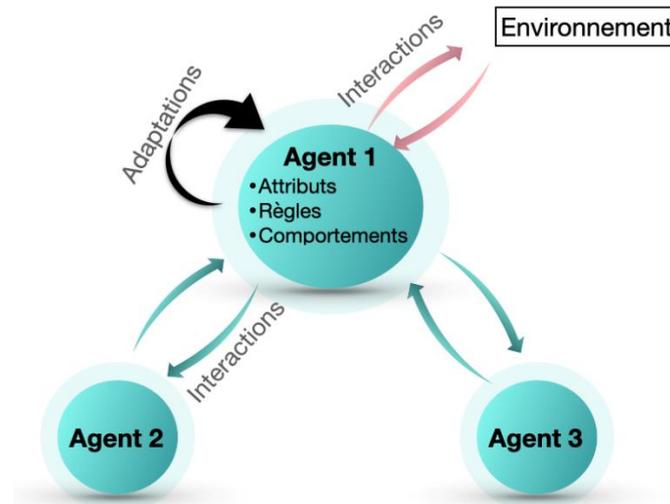


Figure 26. Représentation schématique de la définition d'un agent.

Un agent (représenté ici schématiquement sous la forme d'un cercle) est une entité autonome. L'ensemble des agents représente le système modélisé. Le comportement de chaque agent est régi selon des propriétés qui lui sont conférées sous forme d'attributs, de règles et de comportements. Chaque agent peut agir face aux stimuli de son environnement.

Les modèles basés sur des agents intègrent facilement la notion d'espace. La spatialisation de ces modèles peut être intégrée suivant deux paradigmes : les modèles à espaces discrets construits sur un maillage (« *on-lattice* ») où chaque agent est représenté dans un maillage rigide limitant ses déplacements, et les modèles à espace continu sans maillage (« *off-lattice* ») où l'agent peut se trouver dans un espace défini sans contrainte (Metzcar *et al.*, 2019). Parmi les modèles à espace continu on trouve deux sous-catégories : les modèles qui simulent l'agent sous la forme d'une sphère non déformable et pour lesquels la position dans l'espace est basée sur le centre de la sphère (« *center-based* ») et les modèles qui considèrent l'agent comme étant une sphère déformable (« *boundary-based* »). Dans le premier cas, la forme de l'agent est simplifiée et est considérée comme constante ce qui permet notamment de diminuer les temps de calcul. Ces modèles permettent, par exemple, de servir d'outil complémentaire pour étudier la dynamique spatio-temporelle de croissance des tumeurs sur des données biologiques *in vitro* (Drasdo and Höhme, 2005). Dans le second cas, l'agent est capable de se déformer en réponse à des forces, ainsi la position de l'agent ne tient plus compte du centre mais de ses bordures. Cette catégorie est particulièrement adaptée pour étudier les phénomènes de constriction cellulaire et de réduction de l'adhésion entre cellules dans les mécanismes de l'embryogenèse par exemple (van der Sande *et al.*, 2020). Le temps de simulation associé à cette seconde catégorie est plus élevé de par l'application de ces forces s'exerçant sur l'agent qui, par ailleurs, peuvent être complexes à définir (Figure 27).

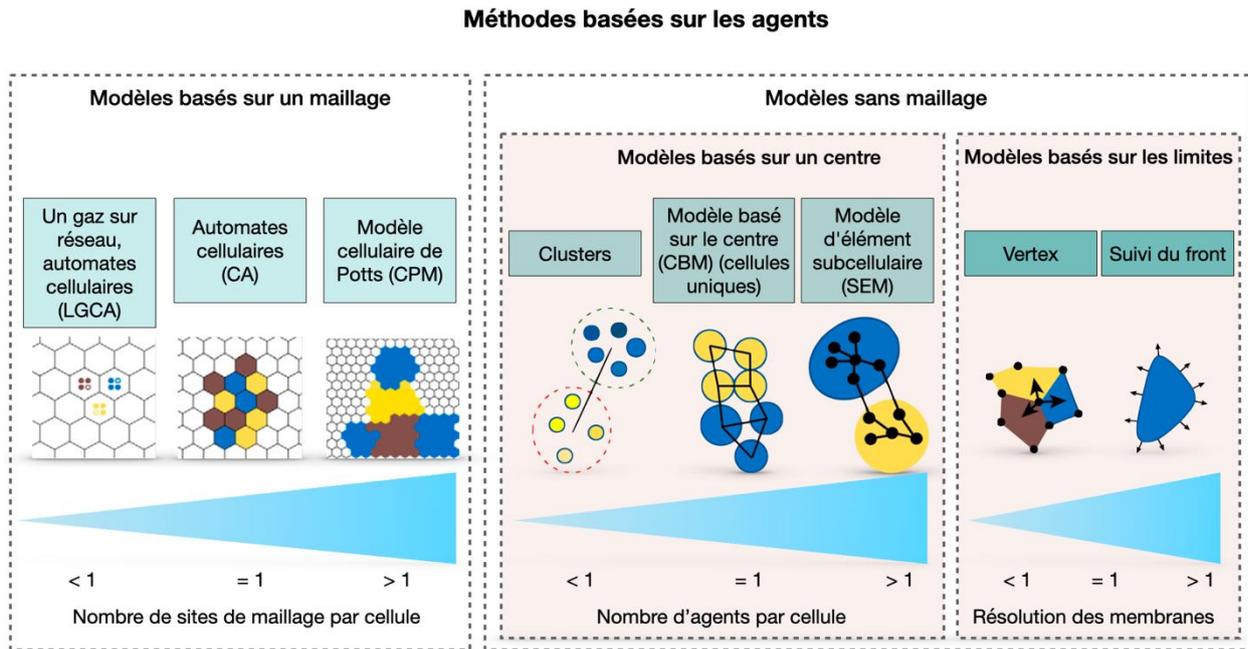


Figure 27. Représentation schématique des différentes approches *in silico* basées sur la cellule.

Illustration adaptée de Metzcar, J., Wang, Y., Heiland, R., & Macklin, P. (2019) « A review of cell-based computational modeling in cancer biology », JCO clinical cancer informatics.

Ces modèles basés sur des agents peuvent être couplés avec d'autres approches afin d'intégrer des données à plusieurs échelles. Ces modèles, dit hybrides, permettent d'associer l'approche ascendante discrète et probabiliste des modèles basés sur des agents avec, par exemple, l'approche descendante continue des équations différentielles (Kim and Lee, 2012; Norton *et al.*, 2019).

Utilisation des modèles basés sur des agents

Les avancées technologiques réalisées dans les laboratoires de biologie permettent de générer des données de plus en plus nombreuses et de plus en plus centrées sur la cellule comme le permet, par exemple, l'approche de séquençage à l'échelle de la cellule (« *single-cell RNA sequencing* »). Ces avancées ont permis, ces dernières années, de focaliser l'utilisation des modèles à base d'agents sur la recherche en oncologie. Ils sont particulièrement bien adaptés aux problématiques de croissance tumorale par exemple (Cleri, 2019). A titre d'illustration, concernant les problématiques d'étude de la réponse inflammatoire, ces modèles ont permis d'explorer l'inflammation chronique du foie, à l'origine de la fibrose hépatique, en intégrant des forces physiques et les différentes interactions biologiques (Dutta-Moscato *et al.*, 2014).

Cette approche a permis aussi d'explorer les mécanismes d'inhibition des chimiokines, produits par les macrophages, sur l'infection par *Leishmania donovani* dans le foie (Moyo et al., 2018), ou encore le rôle du microenvironnement sur la régénération du muscle dans un contexte de myopathie de Duchenne (Virgilio et al., 2018).

Intérêt et limites des modèles basés sur des agents

Avantages

Les modèles basés sur des agents offrent plusieurs avantages. Un des intérêts de cette approche de modélisation est sa capacité à modéliser à l'échelle d'un agent (de la cellule) et d'étudier les phénomènes émergents issus de l'interaction entre ces diverses entités autonomes. Chaque entité répond de façon indépendante à son environnement, ce qui pourrait permettre d'étudier les interactions entre les cellules immunitaires dans un contexte d'étude de l'inflammation. Il est possible d'ajouter facilement des paramètres stochastiques aux agents. C'est notamment un aspect intéressant en biologie qui permet d'ajouter de la variabilité. Cette approche est également capable de prendre en compte la dimension spatio-temporelle, un paramètre d'intérêt pour, par exemple, étudier les interactions entre les cellules du système immunitaire. Par ailleurs, l'utilisation de plateformes, telles que NetLogo (Tisue and Wilensky, 2004) CompuCell3D (Swat et al., 2012), Anylogic (The AnyLogic Company), permet une représentation simple, favorisant les échanges entre les biologistes et les modélisateurs.

Limites

En fonction du problème posé, les modèles basés sur des agents peuvent présenter certaines limites. Le temps de simulation peut rapidement devenir conséquent lorsque le modèle devient complexe (nombre d'agents et de paramètres important). Ces modèles peuvent être difficiles à implémenter, notamment lorsque le modèle à explorer tient compte d'un nombre important d'agents différents. De plus, en fonction du nombre d'agents à modéliser, le nombre de paramètres peut devenir important ce qui peut représenter une contrainte lors de l'étape de calibration du modèle.

2. Modèles basés sur des équations

a. Réseaux booléens

Les réseaux booléens ont été introduits dans les années 1960 par Stuart A. Kauffman, puis par René Thomas (Kauffman, 1969; Thomas, 1973), comme une nouvelle approche pour l'étude de systèmes biologiques. Plus spécifiquement, ces réseaux ont été utilisés à l'époque pour étudier les voies de régulation des gènes. Les réseaux booléens sont, aujourd'hui encore, très utilisés en biologie pour modéliser la dynamique des réseaux de neurones, de régulation génique, et des voies de signalisation cellulaire (Joo *et al.*, 2018; Héroult *et al.*, 2023; Gao *et al.*, 2018).

Les réseaux booléens sont des systèmes dynamiques discrets (Kauffman, 1993), réunissant un nombre fini de variables binaires évoluant, dans un temps discret et par interactions mutuelles, selon une loi prédéfinie. Un réseau booléen peut se caractériser formellement suivant une fonction de vecteurs binaires de dimension n : $f_i : \{0,1\}^n \rightarrow \{0,1\}$ avec $i \in \{1, \dots, n\}$ et f_i aussi appelée fonction booléenne locale de i .

Ces réseaux déterministes sont composés d'un ensemble de variables booléennes qui, par définition, ne peuvent prendre que deux valeurs 0 ou 1. Dans le langage informatique, ces valeurs binaires correspondent aux valeurs logiques FALSE ou TRUE. Les deux états des variables sont également associés à du « ON/OFF » ce qui correspond, par exemple, à un état activé et inactivé d'un gène, la présence ou non d'une cellule dans le modèle. De par cette configuration binaire, les réseaux booléens sont considérés comme un des modèles dynamiques les plus simples (Schwab *et al.*, 2020). Chaque variable est décrite par une fonction booléenne, définie précédemment, permettant de déterminer la valeur de sortie de la variable booléenne à chaque pas de calcul. On nomme configuration du réseau, l'état de tous les composants du réseau définis suivant les vecteurs binaires de dimension n . Les interactions entre variables sont souvent sommairement décrites par un graphe dirigé : le graphe d'interaction (Figure 28).

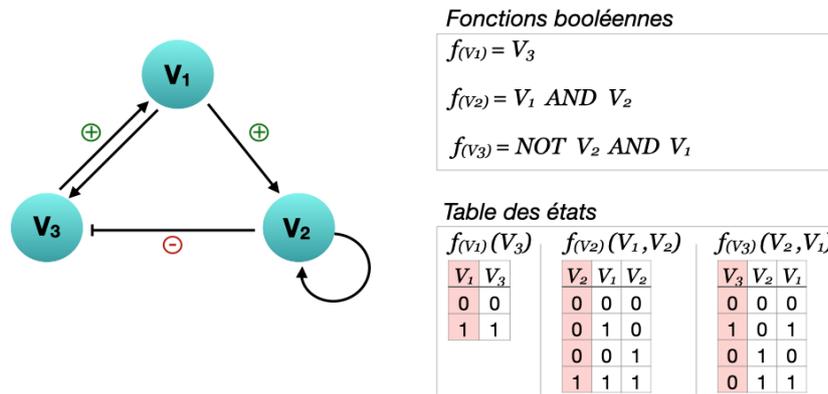


Figure 28. Représentation schématique d'un réseau booléen.

Exemple d'un graphique d'interaction d'un réseau booléen. Les arêtes définissent les interactions entre chaque entité du réseau. Chaque entité (V_1 , V_2 , V_3) peut être dans un état 0/1 (ou inactivé/activé). La transition d'un état à un autre est définie suivant la fonction booléenne locale décrite dans la table des états.

Le graphe d'interaction est composé de nœuds correspondant aux variables booléennes (gènes ou protéines d'intérêt) et d'un ensemble d'arêtes reliant les variables booléennes entre elles. Chaque arête est définie implicitement par une fonction booléenne. Ces arêtes peuvent avoir une influence positive (activation d'un gène) ou négative (inhibition). Le réseau booléen peut être synchrone, auquel cas chaque variable booléenne voit son état recalculé à chaque pas de temps, ou bien asynchrone auquel cas il est supposé qu'une seule variable voit son état modifié à chaque pas de temps (Garg *et al.*, 2008).

Utilisation des réseaux booléens

Cette approche, classifiée comme ascendante (ou « *bottom-up* »), est particulièrement bien adaptée pour l'étude de la robustesse et de la stabilité des voies de régulation des gènes (Albert and Othmer, 2003; Li *et al.*, 2004). Pour pallier l'aspect binaire des valeurs prises par les variables booléennes, une extension nommée « réseau qualitatif » a été introduite. Cette extension permet d'attribuer un intervalle discret de valeurs pour chaque variable dans lequel 0 est le niveau le plus faible et 1 le niveau le plus élevé. A chaque étape, les valeurs des variables peuvent augmenter ou diminuer en prenant des valeurs comprises dans cet intervalle. Par conséquent, cette extension permet d'enrichir les interactions entre les variables du réseau en donnant un aspect semi-quantitatif au modèle (Schaub *et al.*, 2007). Il est par ailleurs possible d'utiliser une approche descendante (ou « *top down* ») dans laquelle, à l'aide d'une grande base

de données, des algorithmes de reconstruction peuvent prédire des interactions régulatrices entre les variables (Maucher *et al.*, 2011).

Des réseaux booléens probabilistes ont également été développés. Ils ont été conçus à l'origine pour incorporer des règles de dépendance entre chaque variable (gène), quantifier l'influence relative et la sensibilité de l'interaction entre les gènes, introduire de la variabilité, mais surtout pour intégrer de la stochasticité dans les réseaux booléens simples, en lieu et place des principes déterministes supportant leur développement (Shmulevich, Dougherty, Kim, *et al.*, 2002). Plusieurs études ont été publiées appliquant cette approche probabiliste dans le cadre d'études de systèmes biologiques et notamment pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques (Shmulevich, Dougherty, and Zhang, 2002). Comparé à un réseau booléen classique, ces réseaux ont notamment permis de prédire des phénotypes d'expression des gènes supplémentaires dans des populations de cellules progénitrices cardiaques impliquées dans le développement précoce du cœur (Grieb *et al.*, 2015). Dans cet exemple, l'extension du réseau booléen utilise la « logique floue » (ou « *fuzzy logic* »), une approche basée sur des "valeurs ou degrés de vérité" caractérisés par des chiffres réels compris entre 0 et 1 et non plus 0 ou 1 comme c'est le cas pour la fonction de transition booléenne. Ce type de réseaux booléens probabilistes a également permis de définir la meilleure intervention permettant d'orienter une trans-différenciation des facteurs de transcription cellulaire (Tercan *et al.*, 2022).

La construction d'un modèle basé sur les réseaux booléens ne nécessite pas d'importante connaissance *a priori* sur le mécanisme à étudier. Cela pourrait être utilisé comme approche exploratoire (Bornholdt, 2008). Divers outils informatiques permettent de modéliser des réseaux booléens comme par exemple BoolNet ou bien encore CellNetAnalyser (Klamt *et al.*, 2007; Müssel *et al.*, 2010).

Intérêt et limites des réseaux booléens

Avantages

L'intérêt de ces réseaux booléens repose sur la volonté de décrire une logique des conditions d'activation des différentes variables du modèle, tout en faisant abstraction des autres propriétés potentielles liées à des aspects quantitatifs (nombre de molécules) ou comportementaux (cinétique). Ainsi, les réseaux booléens présentent l'avantage d'être des modèles dynamiques relativement simples de par la configuration binaire qu'ils offrent et avec une représentation graphique intuitive. Cette dernière permet notamment de faciliter les échanges entre les modélisateurs et les biologistes. Chaque arête qui compose le réseau définit un lien de causalité entre les entités. Ainsi, il est facilement concevable d'établir des liens de cause à effet dans le

mécanisme biologique modélisé. Par ailleurs, un autre atout et pas des moindres, est que la construction d'un réseau booléen nécessite peu de connaissances *a priori* sur le mécanisme à étudier, et permet de construire des modèles qualitatifs (Grieco *et al.*, 2013). Cela peut être une solution de choix pour l'étude de phénomènes biologiques complexes, comme l'étude de la réponse inflammatoire où les interactions et mécanismes biologiques ne sont pas tous connus. C'est également un avantage indéniable, notamment lorsque des données quantitatives sont limitées et lorsque l'on souhaite établir des modèles théoriques afin d'explorer de nouveaux mécanismes (Liu *et al.*, 2022).

Limites

La configuration binaire des réseaux booléens peut être perçue comme un avantage, de par la simplification qui est imposée, mais cela peut également constituer une limite en fonction de la problématique posée. En effet, cette approche considère un niveau de détail limité, elle ne permet pas de traiter des données continues. L'aspect dynamique est implicitement représenté dans ces modèles, ce qui, en fonction de la question posée, peut être perçu comme une limite. Une des limites soulevées est le temps de calcul qui peut s'avérer important lorsque le nombre d'états et d'entités du réseau est élevé (Kerlebach and Shamir, 2008).

b. Réseaux de Petri

Les réseaux de Petri ont été introduits dans les années 1962 par Carl Adam Petri. Ces réseaux étaient à l'origine appliqués pour, par exemple, modéliser des réseaux de communication ou encore de distribution. Ce n'est que plus tard que les réseaux de Petri ont été appliqués pour modéliser des systèmes biologiques, plus particulièrement des réseaux biochimiques (Reddy *et al.*, 1996; Baldan *et al.*, 2010).

Un réseau de Petri est un graphe bipartite composé de « places », correspondant aux ressources du système, et de « transitions » qui correspondent aux événements permettant de changer l'état des ressources (réactions chimiques par exemple).

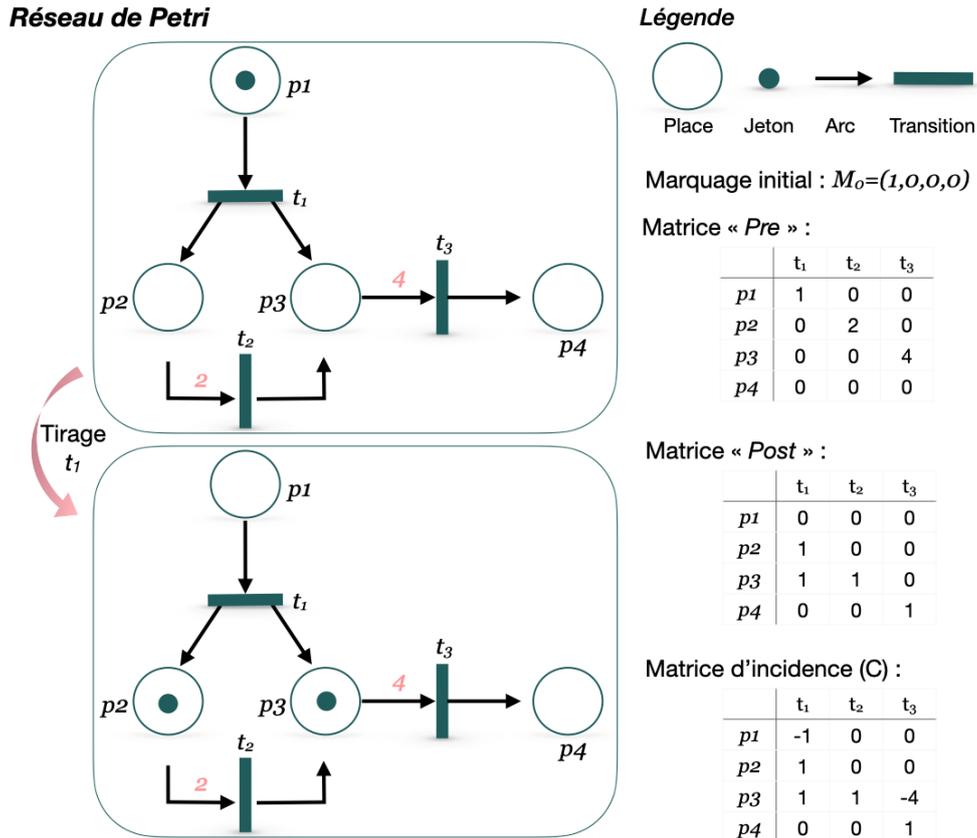


Figure 29. Exemple de réseau de Petri.

Un réseau de Pétri modélise les interactions entre plusieurs entités du système. Il est constitué de places, représentées sous la forme de cercles, et de transitions illustrées sous la forme de traits épais (ou rectangle). Les jetons (cercles pleins) représentent l'état des entités et circulent d'une place à une autre en franchissant une transition (un évènement) suivant le sens des arcs (flèches du réseau). Un arc ne peut connecter qu'une place à une transition (ou d'une transition à une place). Pour qu'un jeton puisse se déplacer d'une place à une autre, il faut que les conditions pour qu'un évènement se réalise soient remplies.

Schématiquement, ce réseau est composé de cercles représentant les places et de rectangles correspondant aux transitions (Figure 29) (Desel and Reisig, 2015). Les flèches dirigées permettent de relier ces deux entités suivant un sens précis. Par définition, une flèche ne peut pas relier deux entités identiques, ainsi la place (condition initiale) doit passer par une étape de transition avant de pouvoir donner un nouvel « état » (condition de sortie). Le principe de ce réseau est basé sur l'utilisation de jetons pouvant passer d'une place à une autre par l'intermédiaire d'une transition correspondant à un évènement. Cet évènement ne peut se produire que si les conditions sont vérifiées, c'est-à-dire si le nombre de jetons dans les places en amont de la transition est suffisant pour la franchir. L'état du système est traduit par un vecteur composé du nombre de ces jetons présents dans chacune des places, on parle alors de

marquage. Pour que ce marquage, ou état du système, soit modifié, il faut qu'une transition puisse être franchie. On dit alors que l'on « tire » la transition choisie. Les places peuvent détenir 0 ou un nombre positif de jetons. Par défaut il faut au moins un jeton dans chaque place amont pour que celle-ci soit valide et puisse être tirée.

Mathématiquement les réseaux de Petri sont représentés sous forme de matrices : une matrice « *Pre* » qui traduit les arcs allant d'une place à une transition et une matrice « *Post* » qui, de façon inverse, traduit les arcs allant d'une transition à une place. Par la suite, une matrice d'incidence du réseau est définie et correspond à la différence entre la matrice « *Post* » et la matrice « *Pre* ». Les réseaux de Petri peuvent être colorés permettant d'attribuer un niveau de couleur aux jetons ainsi qu'aux places, le niveau de couleur étant associé à une donnée (Jensen, 1981). Cette caractéristique permet de suivre le cheminement du jeton dans le réseau. Un exemple simple est l'attribution de deux couleurs distinctes aux jetons afin de représenter deux composants (ou molécules) différents agissant au sein du système.

Plusieurs extensions ont été proposées pour permettre une application plus large de ces réseaux. Parmi eux, on trouve les réseaux de Petri stochastiques qui permettent de se rapprocher de la réalité biologique (Goss and Peccoud, 1998; F. Liu *et al.*, 2016). Chacune des transitions est soumise à des règles de probabilités et définie par des lois de probabilité (loi exponentielle, uniforme) qui permettent de déterminer leur déclenchement. Les réseaux de Petri stochastiques sont isomorphes aux chaînes de Markov, ces derniers permettent notamment de modéliser l'évolution au cours du temps d'un système aléatoire (Chodera and Noé, 2014).

Une extension plus récente nommée « réseau de Petri continu flou », permet de modéliser un réseau de Petri avec des données de cinétique biologique inconnues qui décrivent les taux de déclenchement des transitions. Cette extension utilise la logique floue qui peut aider à la description du modèle dans le cas où les données biologiques ne sont pas accessibles (Bordon *et al.*, 2018). Les réseaux de Petri, classiquement utilisés pour décrire des événements discrets, peuvent être combinés à une approche continue. On parle alors de réseaux de Petri hybrides (David and Alla, 2001). Il est également possible, à l'aide de réseaux de Petri temporisés, d'ajouter des délais déterministes au niveau des transitions pour, par exemple, évaluer les délais dans la transduction d'un signal (Chen *et al.*, 2007).

D'autres approches, en dehors des réseaux booléens et de Petri, ont été appliquées à la biologie pour l'étude de processus biochimiques, parmi lesquelles les processus algébriques (Regev *et al.*, 2001). Cette approche récente est encore aujourd'hui peu développée, elle ne sera pas présentée dans cet état de l'art.

Utilisation des réseaux de Petri

En biologie, les réseaux de Petri peuvent permettre l'exploration mais aussi la validation de la structure des réseaux métaboliques par une analyse qualitative (Koch *et al.*, 2005; Schuster *et al.*, 2002). Dans l'étude de l'inflammation, les réseaux de Petri ont notamment été utilisés pour démontrer l'importance de l'interleukine-10 dans le processus inflammatoire induit par une infection à *Leishmania donovani* (Albergante *et al.*, 2013) et pour prédire l'activation des lymphocytes T CD8 et de l'immunité antivirale (Polak *et al.*, 2017). Ces réseaux ont également permis d'étudier l'implication de l'interleukine-18 dans l'athérosclérose (Formanowicz, Rybarczyk, Radom, Tanaś, *et al.*, 2020), d'évaluer l'implication de l'inflammation et de l'immunité dans le maintien de l'hypertension (Formanowicz, Rybarczyk, Radom, and Formanowicz, 2020) ou encore d'étudier la reprogrammation phénotypique des macrophages au cours de l'inflammation (Ribeiro *et al.*, 2019).

Intérêt et limites des réseaux de Petri

Avantages

Les réseaux de Petri sont faciles à implémenter. En effet, ils ne nécessitent pas d'approche mathématique complexe. La représentation graphique de ces réseaux est plutôt intuitive. Ce formalisme permet un échange facilité avec les biologistes. Des outils informatiques ont notamment été développés pour permettre une utilisation et une visualisation de ces réseaux de Petri, comme par exemple CPN Tool et Snoopy (Heiner *et al.*, 2012; Westergaard and Kristensen, 2009). Cependant, en fonction de la complexité du réseau, celui-ci peut rapidement être difficile à interpréter.

Limites

Les réseaux de Petri utilisent des données continues. Par conséquent, les simulations ne peuvent pas être lancées si les valeurs des paramètres de cinétique n'ont pas été déterminées au préalable. Cela peut constituer un inconvénient, notamment dans notre problématique où nous possédons des données de cinétiques sur certaines populations de cellules immunitaires, cependant nous ne connaissons pas les valeurs des paramètres de cinétique. Par ailleurs, il est possible de pallier ce problème en utilisant la logique floue. Ces réseaux de Petri permettent d'intégrer de l'incertitude et des imprécisions (Liu *et al.*, 2017). Le réseau de Petri est une approche discrète ce qui, dans notre cas d'étude notamment, peut être perçu comme une limite.

c. Les réseaux bayésiens

Les réseaux bayésiens appartiennent à une classe de modèles graphiques qui par définition correspondent à des modèles probabilistes représentant un ensemble de variables aléatoires. Les réseaux bayésiens ont été introduits en 1985 par Judea Pearl (Pearl, 1985). Ce n'est qu'à partir des années 1990 que des avancées ont été faites sur les applications des réseaux bayésiens, notamment avec les recherches de Microsoft (Heckerman, 1995). L'invention des réseaux bayésiens a permis d'apporter une forte contribution dans le domaine de l'intelligence artificielle mais également dans des branches de l'ingénierie et des sciences naturelles. Judea Pearl reçut pour cela le prix Turing en 2011, un prix récompensant les grandes avancées informatiques.

Ces réseaux se basent sur la statistique bayésienne et sur le théorème de Bayes, formulé par le scientifique éponyme dans les années 1763, avec pour objectif de décrire la notion de probabilité conditionnelle. Il peut s'écrire ainsi :

$$P(A | B) = \frac{P(B | A) \cdot P(A)}{P(B)} \quad (1)$$

avec la condition que $P(B) \neq 0$, où A et B représentent deux événements, $P(A)$ et $P(B)$ constituent les probabilités des deux événements, puis $P(A | B)$ représente la probabilité conditionnelle que l'événement A se réalise en sachant que l'évènement B s'est réalisé. Enfin $P(B | A)$ représente la probabilité conditionnelle que l'évènement B se réalise en sachant que l'évènement A s'est réalisé.

Ce théorème permet d'exprimer la probabilité qu'un événement A se produise en fonction de la probabilité de B. Par conséquent, la loi de Bayes permet de calculer des probabilités de réalisation d'événements ce qui est particulièrement utilisé dans l'évaluation des risques, notamment l'évaluation des risques écologiques (Pollino *et al.*, 2007), ou encore le management des ressources (Ojha *et al.*, 2018).

Ce réseau permet une représentation graphique intuitive des connaissances. C'est un graphique orienté dont les nœuds représentent des variables aléatoires et les arcs expriment des interdépendances entre ces variables, décrites par les probabilités conditionnelles du théorème de Bayes (Figure 30). Les relations établies entre les variables permettent de décrire des hypothèses. La notion « stochastique » supportée par l'approche permet l'ajout d'incertitudes (épistémique, aléatoire ou de mesure) sur la construction de chaque événement ce qui représente

un avantage, notamment pour la description de phénomènes biologiques. Par définition, le réseau bayésien est un graphique dirigé acyclique. Par conséquent, il n'est pas possible d'intégrer les phénomènes de boucle de rétroaction qui sont fréquemment retrouvés dans les mécanismes biologiques ce qui peut constituer une limite de l'approche. Cependant, pour pallier cette limite, il est possible d'établir des réseaux bayésiens dynamiques permettant une description plus précise de l'évolution du processus étudié au cours du temps (Kim *et al.*, 2004; Zandonà *et al.*, 2019). Ces réseaux bayésiens dynamiques reposent sur le même principe qu'un réseau bayésien, mais ils intègrent la possibilité que l'état d'une variable à un instant puisse dépendre de son état à l'instant précédent (Murphy, 2002). Les réseaux bayésiens dynamiques pourraient ainsi convenir au cadre de modélisation étudié en intégrant les aspects cinétiques d'évolution des phénomènes mis en jeu.

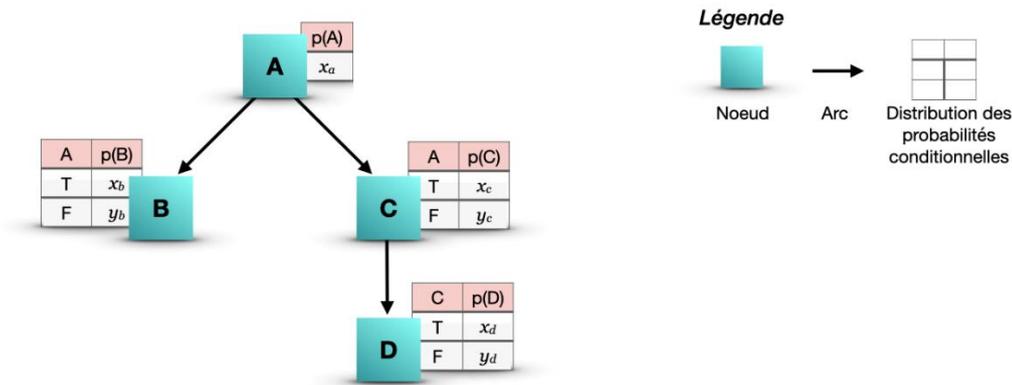


Figure 30. Représentation schématique d'un réseau bayésien.

Un réseau bayésien est un modèle probabiliste présenté sous la forme d'un graphique orienté. A chaque nœud du réseau est associée une table de probabilités conditionnelles. La relation de dépendance entre ces nœuds, illustrée par un arc dirigé, est ainsi définie par une loi de probabilité.

Utilisation des réseaux bayésiens

De par ces propriétés, le réseau bayésien se prête à l'établissement d'un pronostic et/ou d'un diagnostic (Agrahari *et al.*, 2018; Bandyopadhyay *et al.*, 2015; Khademi and Nedialkov, 2015). Il est également utilisé dans l'exploration des réseaux de régulation des gènes (Zou and Conzen, 2005). Les modèles de réseaux bayésiens ont permis, par exemple, de déterminer des marqueurs de l'inflammation et de la résistance à l'insuline comme paramètres de prédiction du changement de poids chez les individus obèses (Kong *et al.*, 2013). Dans l'étude de la réponse inflammatoire, ils ont permis d'étudier l'implication de l'endotoxine dans la régulation

de la réponse inflammatoire dans l'ascite (Emr *et al.*, 2014), ou encore d'identifier le gène Prdm1 comme étant un régulateur négatif de la différenciation de cellules humaines TH17 (Acerbi *et al.*, 2016).

Parmi les logiciels permettant la création et l'analyse de ces réseaux bayésiens on peut citer Netica, Bayesia Lab, Hugin, ... dont l'utilisation est relativement intuitive (Conrady and Jouffe, 2013; Madsen *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2011).

Intérêt et limites des réseaux bayésiens

Avantages

Cette approche permet de visualiser les relations entre les variables de façon intuitive grâce à une représentation graphique (Marcot and Penman, 2019). Grâce à la théorie des probabilités, les réseaux bayésiens permettent d'inclure des incertitudes dans les données ainsi que sur les relations entre chaque variable. C'est une approche qui est capable de faire du pronostic et/ou du diagnostic (Verduijn *et al.*, 2007). Ces réseaux sont stochastiques de par leur formalisme probabiliste. Ainsi, ils permettent d'insérer des phénomènes aléatoires, un aspect intéressant pour la modélisation des systèmes biologiques complexes (Needham *et al.*, 2007).

Limites

Le réseau bayésien est représenté sous la forme d'un graphique acyclique. Donc par définition, il n'y a pas de possibilité d'intégrer des boucles de rétroaction ce qui peut être contraignant pour la modélisation de processus biologique. Des méthodes existent pour pallier ce problème comme l'utilisation de réseaux bayésiens dynamiques, présenté précédemment (Murphy, 2002). Cette extension permet de décrire l'évolution temporelle de chaque variable aléatoire.

d. Equations différentielles

Les équations différentielles, qui permettent de décrire l'évolution d'un système au cours du temps, constituent, à l'heure actuelle, l'approche de modélisation la plus utilisée pour l'étude de la dynamique d'un phénomène biologique. La découverte du calcul différentiel et intégral a été initiée par Newton et Leibnitz en 1686. Les calculs différentiels ont été largement appliqués dans le domaine de la physique, notamment en mécanique des fluides avec les équations d'Euler développées par Leonhard Euler en 1757, les équations de Navier-Stokes développées par Henri Navier et George Gabriel Stokes en 1845, l'équation sur la relativité d'Einstein établie

en 1915 ou encore les équations sur la mécanique quantique de Schrödinger et Heisenberg en 1925.

A partir de 1798, les calculs différentiels ont été appliqués à l'étude de la dynamique des populations par Thomas Robert Malthus, reporté dans son ouvrage « Essai sur le principe de population » (Malthus, 1798). Le modèle de Malthus a permis de prédire la croissance exponentielle de la population tandis que l'approvisionnement alimentaire croît de façon arithmétique. Un autre modèle relativement répandu dans l'étude des populations est celui développé par Alfred James Lotka en 1925 et Vito Volterra en 1926 dans l'ouvrage intitulé « Une théorie mathématique de la lutte pour la vie » (Volterra, 1927). Ce modèle de prédation de Lotka-Volterra communément nommé « modèle proie-prédateur » a été utilisé pour étudier la dynamique des populations des prédateurs (comme le lynx) et de leur proie (le lièvre). Enfin, les équations différentielles ont largement apporté leur contribution dans l'étude des propagations des épidémies grâce au célèbre modèle SIR (Susceptibles, Infectés, Rétablis) développé par Anderson Gray McKendrick et William Ogilvy Kermack en 1927 (McKendrick and Kermack, 1927).

Ce n'est qu'à partir du XX^{ième} siècle que les équations différentielles ont été plus largement appliquées à des problématiques du vivant. L'utilisation des équations différentielles pour l'étude de phénomènes dépendant du temps a permis d'apporter des pistes de compréhension notables, notamment sur des mécanismes cellulaires dans le domaine de la recherche sur le cancer. Les premiers travaux ont permis d'explorer les mécanismes de régulation de la voie Raf-MEK-ERK (Huang and Ferrell, 1996), l'exploration de la cinétique d'activation de la cascade de la protéine kinase MAPK à l'échelle cellulaire (Jr. and Machleder, 1998), ou encore l'exploration de la formation de complexes protéiques « d'échafaudage » sur la transduction d'un signal (Levchenko *et al.*, 2000).

D'un point de vue mathématique, une équation différentielle correspond à une équation dont l'inconnue est une fonction numérique continue et dérivable associée à sa ou ses dérivées au point. Elle s'écrit sous la forme :

$$\frac{dx}{dt} = f(t, y) \quad (2)$$

où t désigne le temps, $x \in \mathbb{R}^n$ la variable dont on décrit l'évolution. C'est une approche déterministe où, à chaque instant t , la valeur de la fonction numérique $x(t)$ décrit l'état du système à l'instant t . Dans ce cas-là on parle d'équation différentielle ordinaire où la fonction

inconnue ne dépend que de la variable t . Si l'équation dépend de plusieurs variables, comme par exemple le temps et l'espace (x, y, z) , on parle alors d'équation différentielle partielle. Il existe également des équations différentielles à retard (ou « *delay differential equation* ») qui traduisent une dépendance entre l'état de la variable à un instant t et son état passé $t - 1$.

Ces équations différentielles permettent de décrire l'évolution d'un système à partir d'hypothèses faites sur la manière dont évolue le système en fonction du temps. Un modèle basé sur des équations différentielles peut être classifié comme une approche descendante (ou « *top-down* »), dans laquelle on ne considère que des propriétés globales agrégées pour chaque variable, contrairement aux modèles « agents » où chaque propriété est spécifique à un agent (Bianca and Pennisi, 2012). Ainsi, dans un modèle mathématique l'évolution de chaque variable dans un système d'équations différentielles est dépendante du système lui-même et non de l'interaction entre l'agent et son environnement. L'explication du comportement du système observé numériquement ne pourra s'expliquer que par des propriétés globales des variables modélisées. C'est une approche quantitative et continue qui nécessite de connaître le mécanisme et les paramètres. Cependant, il peut être compliqué de connaître les valeurs biologiques de certains paramètres cinétiques qui sont, la plupart du temps, difficilement mesurables. Cela nécessite de passer par des étapes de calibration pour déterminer leurs valeurs.

Utilisation des systèmes différentiels

Des modèles mathématiques, basés sur l'élaboration de systèmes différentiels, ont été développés pour permettre notamment l'étude de la réponse inflammatoire. Par exemple, dans un contexte de développement de la plaque d'athérome, avec la modélisation des interactions entre les lipoprotéines et les cellules du système immunitaire, le modèle permet de mettre en avant l'implication de chacune de ces variables sur le développement de l'athérosclérose (Chalmers *et al.*, 2015). D'autres modèles permettent d'étudier la réponse immunitaire face à un défi bactérien et peuvent servir d'outil pour mener des expériences *in silico* avec des traitements antibactériens (Caudill and Lynch, 2018), ou encore pour modéliser la réponse immunitaire suite à une allo-transplantation permettant ainsi d'établir un outil de prédiction personnalisé en clinique (Day *et al.*, 2015). D'autres études impliquées dans la modélisation de la réponse inflammatoire seront détaillées par la suite.

Des logiciels, tels que AnyLogic, GoldSim, permettent de faciliter la création et la visualisation des systèmes dynamiques.

Intérêt et limites des systèmes différentiels

Avantages

Les systèmes différentiels sont par définition dynamiques et continus. En fonction du problème posé, ces propriétés peuvent être intéressantes pour suivre l'évolution au cours du temps d'une population cellulaire immunitaire par exemple. Les systèmes différentiels peuvent décrire plusieurs populations cellulaires au cours du temps. Leur temps de calcul est peu coûteux. Cette approche de modélisation permet également d'intégrer la notion spatiale dans les équations en utilisant des équations différentielles partielles.

Limites

En fonction de la problématique posée, les équations différentielles peuvent devenir contraignantes à l'utilisation. En effet, la contrainte la plus importante est la détermination exacte des constantes cinétiques du modèle permettant de correspondre aux propriétés quantitatives du système étudié. En effet, la plupart des constantes cinétiques présentes dans les équations différentielles sont inconnues, car difficilement mesurables par des expériences biologiques. Cela nécessite soit la récupération de valeurs de ces constantes dans la littérature à partir de modèles semblables à celui élaboré, ou bien le développement d'algorithmes permettant de pallier cette problématique. Cette approche nécessite d'avoir des données biologiques de la cinétique de la variable à étudier pour permettre la détermination des constantes du modèle. En effet, plus il y a de données biologiques décrivant l'évolution au cours du temps de la variable, plus la calibration du modèle sera facilitée. L'utilisation des équations différentielles ne permet pas, dans une application classique, de générer de l'aléatoire. Cependant, certaines méthodes permettent d'ajouter des événements aléatoires comme par exemple l'algorithme de Gillespie qui utilise des probabilités pour modéliser des événements (Gillespie, 2000).

En résumé, de nombreuses approches de modélisation *in silico* existent comme cela vient d'être évoqué. La liste présentée dans ce manuscrit n'est pas exhaustive mais permet d'apporter un aperçu sur les principales approches de modélisation *in silico* existantes. Ces approches *in silico* variées possèdent des spécificités, avec des avantages et des limites intrinsèques ou extrinsèques. Ces différentes approches permettent de répondre à une variété de problématiques biologiques mais doivent être sélectionnées en fonction du contexte à modéliser, des données à disposition et des objectifs à atteindre.

C. Quelques exemples de modèles mathématiques de la réponse inflammatoire

La modélisation mathématique de la réponse inflammatoire s'est essentiellement développée ces dernières décennies. Elle a notamment contribué à saisir toute la complexité de la réponse immunitaire induite à la suite de lésions, ou d'infections, en tenant compte de la non-linéarité des mécanismes et des boucles de rétroaction. Les modèles développés permettent de comprendre les mécanismes moteurs, simuler des scénarios ce qui est notamment utile pour optimiser des protocoles cliniques, et cibler des expériences.

Ces modèles sont développés à travers diverses thématiques telles que l'athérosclérose (Abi Younes and El Khatib, 2022; El Khatib *et al.*, 2012; Ougrinovskaia *et al.*, 2010), les maladies pulmonaires (Ceresa *et al.*, 2018; Karelina *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013; Mochan *et al.*, 2014; Schirm *et al.*, 2016), ou encore dans l'étude de la progression tumorale (Mahasa *et al.*, 2016; Mahlbacher *et al.*, 2019) par exemple. Dans cet état de l'art il sera présenté une brève sélection de travaux utilisant des modèles mathématiques se rapprochant de l'objet d'étude de ce travail. Il sera retenu les modèles mathématiques incluant les macrophages dans leur système d'équation et dans le cas d'une réponse inflammatoire associée à un contexte de dommage tissulaire ou d'infection. Les modèles incluant un paramètre de spatialité ne seront pas retenus.

1. Modèle de Day et ses collaborateurs (2006)

Day et ses collaborateurs ont constitué, à la suite d'un précédent travail (Reynolds *et al.*, 2006), un modèle de la réponse inflammatoire aiguë initiée par l'injection d'endotoxine (lipopolysaccharide issu de la bactérie), mimant ainsi la réponse inflammatoire induite par une infection bactérienne (Day *et al.*, 2006). Ils développent un système d'équations différentielles couplées réduit, composé de quatre équations décrivant l'évolution au cours du temps des cellules immunitaires effectuant la phagocytose (N^*), du dommage tissulaire (marqueur pro-inflammatoire) (D), des médiateurs anti-inflammatoires (C_A) et de l'administration de l'endotoxine (P_E) (Figure 31).

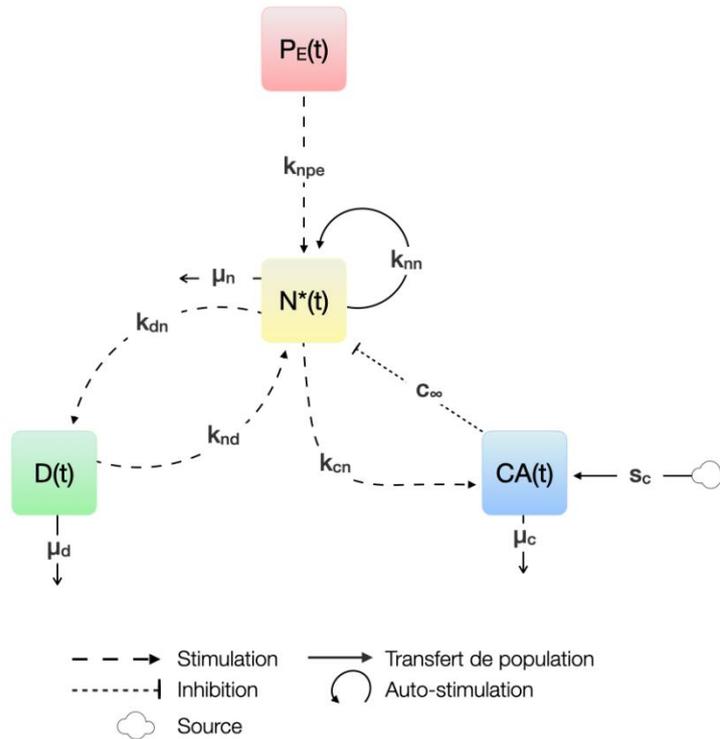


Figure 31. Représentation schématique du modèle de Day et ses collaborateurs (2006).

Modèle de la réponse inflammatoire aiguë incluant les cellules phagocytaires (N^*), le dommage tissulaire (pro-inflammatoire) (D), les médiateurs anti-inflammatoires (C_A) et l'administration de l'endotoxine (P_E). Cette illustration se base sur le système d'équations différentielles décrit dans l'article de Day et ses collaborateurs, (2006) « A reduced mathematical model of the acute inflammatory response II. Capturing scenarios of repeated endotoxin administration », *Journal of theoretical biology*.

Le recrutement des cellules immunitaires, après administration d'endotoxine (fonction de Heaviside), est décrit à l'aide de l'équation de Michaelis-Menten. Ce recrutement est stimulé par l'administration d'endotoxine, le dommage tissulaire généré et la production des médiateurs pro-inflammatoires. A l'inverse, il est ralenti par la production de médiateurs anti-inflammatoires. Dans cette étude les auteurs ont pu déterminer, à l'aide de données biologiques expérimentales, les valeurs des paramètres de leur système. Bien que ce système soit considéré comme « réduit », ils montrent que le modèle apporte suffisamment de complexité permettant d'être cohérent avec les observations biologiques sur la tolérance de l'endotoxine. Ainsi, ils mettent en évidence que les cinétiques d'apparition et de décroissance des médiateurs pro- et anti-inflammatoires sont des déterminantes clés. Par ailleurs ils soulignent que leur modèle ne peut pas prédire des mesures quantitatives car ils n'associent pas de médiateurs biologiques aux variables choisies, excepté pour P_E .

2. Modèle de Cooper et ses collaborateurs (2015)

Le modèle mathématique développé par Cooper et ses collaborateurs décrit l'effet de deux médiateurs systémiques, l'œstrogène et le cortisol, sur la dynamique de la réponse inflammatoire (Cooper *et al.*, 2015). Ces deux médiateurs sont notamment connus pour avoir un rôle dans la régulation de l'inflammation et participent, dans le cas des traumatismes, à la mise en place d'une inflammation chronique (Kanda and Watanabe, 2005; Bereshchenko *et al.*, 2018; Gilliver, 2010). L'inclusion de ces hormones permet de tenir compte du sexe du patient dans la dynamique de la réponse inflammatoire ce qui pourrait conduire à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le système d'équations décrit la dynamique des débris (P_i) présents au sein de la plaie, des agents pathogènes (P), des neutrophiles (N) et des macrophages (M) (Figure 32).

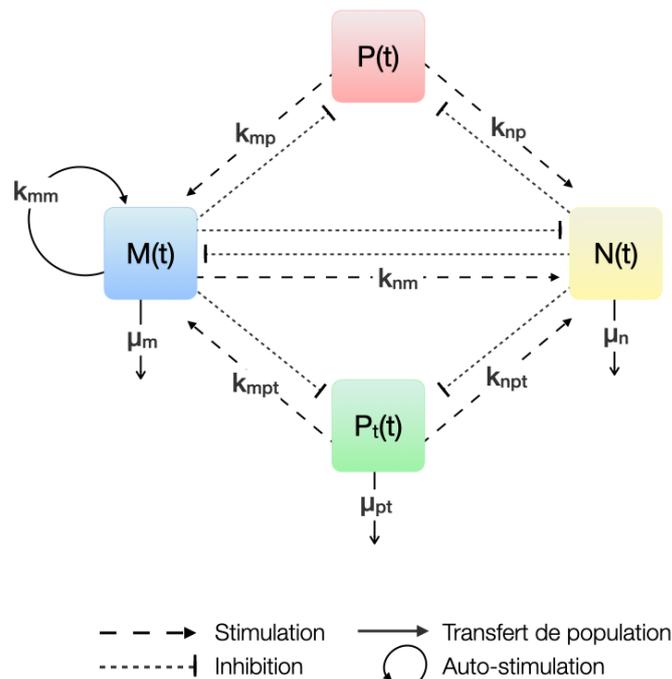


Figure 32. Représentation schématique du modèle de Cooper et ses collaborateurs (2015).

Modèle étudiant l'effet de médiateurs (œstrogène et cortisol) sur la réponse inflammatoire. La dynamique des pathogènes (P), des débris (P_i), des neutrophiles (N) et des macrophages (M) est déterminée par le système d'équations différentielles proposé par les auteurs. Cette illustration est adaptée du schéma (Fig. 1) de l'article de Cooper et ses collaborateurs, (2015) « Modeling the effects of systemic mediators on the inflammatory phase of wound healing », *Journal of theoretical biology*.

Cette étude permet de décrire l'interaction avec les deux types cellulaires majeurs de la réponse inflammatoire à savoir les neutrophiles et les macrophages à la suite d'un dommage tissulaire. L'afflux des macrophages au cours de la réponse inflammatoire est défini par une équation de Michaelis-Menten. Ce recrutement est favorisé par la présence des débris cellulaires, des pathogènes, des neutrophiles ainsi que des macrophages eux-mêmes. Le cortisol étant un inhibiteur de la phagocytose par les macrophages, une fonction d'inhibition est ainsi utilisée permettant de réguler l'activité des macrophages. L'originalité de cette étude porte sur l'inclusion des médiateurs hormonaux. Les auteurs montrent dans leur modèle que l'absence des macrophages induit une réponse plus longue des neutrophiles mais qui permet toutefois de débarrasser le site lésé des débris cellulaires et pathogènes. L'estimation des différents paramètres du modèle à l'aide de l'échantillonnage par hypercube latin a permis de générer des combinaisons de paramètres qui correspondent qualitativement aux différentes dynamiques de réponses inflammatoires retrouvées dans la population. Les auteurs indiquent que ce travail a eu pour objectif de produire un modèle de la réponse inflammatoire qui sera par la suite inclus dans un modèle comprenant les autres étapes de la réparation tissulaire.

3. Modèle de Torres et ses collaborateurs (2019)

Torres et ses collaborateurs ont développé un modèle mathématique de l'afflux séquentiel de cellules immunitaires en réponse à un stimulus bactérien (Torres *et al.*, 2019). Le système est composé de six équations ordinaires (équations (3) à (8)) décrivant l'évolution au cours du temps des macrophages inflammatoires (M1), résolutifs (M2), des neutrophiles (N), des neutrophiles apoptotiques (AN), des pathogènes (P) et des nutriments (B) (Figure 33).

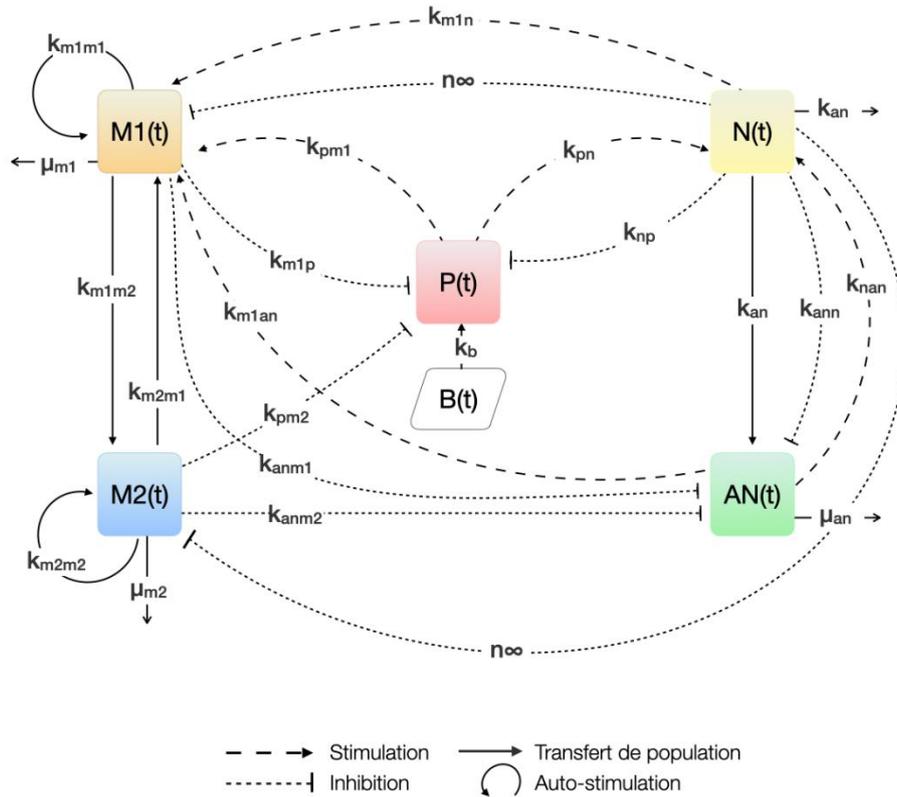


Figure 33. Représentation schématique du modèle de Torres et ses collaborateurs (2019).

Modèle de la réponse inflammatoire incluant les macrophages inflammatoires (M1), les macrophages résolutifs (M2), les neutrophiles (N), les neutrophiles apoptotiques (AN), les pathogènes (P) et les nutriments (B). Cette illustration est adaptée du schéma (Fig. 2) de l'article de Torres et ses collaborateurs, (2019) « Identifying important parameters in the inflammatory process with a mathematical model of immune cell influx and macrophage polarization », *PLoS computational biology*.

$$\frac{dM1}{dt} = \frac{\overbrace{s_{mr}R_{M1}(P, N, M1, AN)}^{\text{taux d'activation/influx}}}{(\mu_{mr} + R_{M1}(P, N, M1, AN) + R_{M2}(M2))} - \overbrace{\frac{\text{changement phénotypique (M1 à M2) par phagocytose (AN)}}{k_{m1m2}k_{anm1}ANf_i(M1, N)}} - \overbrace{\frac{\text{changement phénotypique (M2 à M1)}}{k_{m2m1}M2}} + \overbrace{\frac{\text{décroissance}}{\mu_{m1}M1}} \quad (3)$$

$$\frac{dM2}{dt} = \frac{\overbrace{s_{mr}R_{M2}(M2)}^{\text{taux d'activation/influx}}}{\mu_{mr} + R_{M1}(P, N, M1, AN) + R_{M2}(M2)} + \overbrace{\frac{\text{changement phénotypique (M1 à M2) par phagocytose (AN)}}{k_{m1m2}k_{anm1}ANf_i(M1, N)}} - \overbrace{\frac{\text{changement phénotypique (M2 à M1)}}{k_{m2m1}M2}} - \overbrace{\frac{\text{décroissance}}{\mu_{m2}M2}} \quad (4)$$

avec le taux d'activation exprimé par R_{M1} et R_{M2} :

$$R_{M1} = \overbrace{\frac{\text{activation par les P}}{k_{m1p}P}} + \overbrace{\frac{\text{activation par les sous-produits de N}}{k_{m1n}N}} + \overbrace{\frac{\text{activation par les M1 et leurs cytokines}}{k_{m1m1}M1}} + \overbrace{\frac{\text{activation par les AN nécrotiques}}{k_{m1an}\mu_{an}AN}}$$

$$R_{M2} = \overbrace{\frac{\text{activation par les M2 et leurs cytokines}}{k_{m2m2}M2}} + \overbrace{\frac{\text{cytokines anti-inflammatoires}}{\tilde{k}_c}}$$

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\overbrace{\frac{\text{taux d'activation}}{s_{nr}R_N(P, AN)}}}{\mu_{nr} + R_N(P, AN)} - \overbrace{\frac{\text{apoptose}}{k_{an}N}} \quad (5)$$

$$\frac{dAN}{dt} = \overbrace{\frac{\text{apoptose des N}}{k_{an}N}} - \overbrace{\frac{\text{phagocytose par les M1}}{k_{anm1}ANf_i(M1, N)}} - \overbrace{\frac{\text{phagocytose par les M2}}{k_{anm2}ANf_i(M2, N)}} - \overbrace{\frac{\text{phagocytose par les N}}{k_{ann}N}} - \overbrace{\frac{\text{nécrose}}{\mu_{an}AN}} \quad (6)$$

$$R_N = \overbrace{\frac{\text{activation par les P}}{k_{np}P}} + \overbrace{\frac{\text{activation par les AN nécrotiques}}{k_{nan}\mu_{an}AN}}$$

$$\frac{dP}{dt} = \overbrace{k_{pg}P \left(1 - \frac{P}{P_\infty + B}\right)}^{\text{croissance logistique}} - \overbrace{\frac{\text{phagocytose par les N}}{k_{pn}PN}} - \overbrace{\frac{\text{phagocytose par les M1}}{k_{pm}Pf_i(M1, N)}} - \overbrace{\frac{\text{phagocytose par les M2}}{k_{pm}Pf_i(M2, N)}} \quad (7)$$

$$\frac{dB}{dt} = \overbrace{\frac{\text{consommation par les P}}{-k_bBP}} \quad (8)$$

avec la fonction d'inhibition $f_i(x, N)$:

$$f_i(x, N) = \frac{x}{1 + \left(\frac{N}{n_\infty}\right)^2}$$

Dans ce système, l'évènement initiant la réponse inflammatoire est l'augmentation logistique du nombre de pathogènes au niveau du tissu, stimulée par la présence de nutriments nécessaires à la prolifération des pathogènes. Ces pathogènes induisent un recrutement des macrophages M1, décrit suivant l'équation de Michaelis-Menten. Ces macrophages ont la particularité de pouvoir changer de phénotype et devenir des M2 par efférocytose. Ainsi, la population de macrophages M2 croît, d'une part, suivant le taux d'activation exprimé par l'équation de Michaelis-Menten et, d'autre part, suivant le taux de changement phénotypique des macrophages M1 en M2, traduit par le paramètre d'efférocytose. En parallèle, ce modèle décrit un recrutement des neutrophiles (N), dans le tissu, dépendant de l'équation de Michaelis-Menten. La population des neutrophiles diminue au cours de la réponse inflammatoire. Cette diminution est, dans le modèle, principalement due à leur entrée en apoptose. Ils sont alors transférés dans la population des neutrophiles apoptotiques (AN).

En synthèse, les auteurs ont construit un modèle de réponse inflammatoire pouvant aussi bien être adapté à une condition d'infection qu'à une condition de lésion tissulaire associée à la présence de pathogènes. Ce modèle permet de décrire l'interaction étroite entre les macrophages et les neutrophiles, un dialogue particulièrement important dans la réponse inflammatoire comme nous l'avons discuté dans le chapitre 1 de ce manuscrit. De plus, ce modèle permet également de décrire l'évolution au cours du temps des sous-populations de macrophages M1 et M2. La particularité de cette étude est que les auteurs adaptent leur modèle à des données biologiques issues d'un modèle d'infection dans la cavité péritonéale du petit mammifère. L'analyse de sensibilité de leur modèle amène à la conclusion que les neutrophiles apoptotiques sont un acteur clé du processus inflammatoire. Ce résultat est notamment en accord avec la littérature actuelle sur ce mécanisme biologique (El Kebir and Filep, 2013; Fox *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2018).

Chapitre 4. Principes de calibration de modèle

A. Généralités

1. Calibration d'un modèle *in silico*

Par définition, la calibration d'un modèle mathématique correspond à l'étape d'estimation de l'ensemble des paramètres inconnus qui composent le système d'équations différentielles. Ces paramètres doivent être déterminés et ajustés, afin que le comportement du modèle (ou sorties du modèle) corresponde au mieux aux observations biologiques. L'intérêt de calibrer un modèle est de pouvoir vérifier que le système permet de décrire le phénomène biologique et notamment de prédire son comportement.

De manière générale, certains de ces paramètres peuvent être directement déterminés à partir des données issues des expériences biologiques ou de la connaissance (littérature scientifique). Cependant, la plupart sont difficilement mesurables, notamment lorsque le modèle porte sur la description d'un mécanisme physiologique *in vivo* dans lequel les paramètres ne sont pas contrôlables indépendamment les uns des autres (ou trop difficilement accessibles). L'acquisition de données biologiques étant souvent longue et coûteuse, les jeux de données sont souvent relativement restreints, à la fois dans le nombre de réplicats et en cinétique. La conception idéale d'un modèle *in silico* reposerait sur l'expérimentation biologique en parallèle de la conception du modèle *in silico*. Cette stratégie permettrait d'offrir les valeurs « biologiques » à chaque paramètre du modèle *in silico*. Cependant, dans une majorité des cas, les modèles *in silico* sont établis *a posteriori* à partir des données biologiques, comme cela est le cas dans le cadre de cette thèse. L'intérêt est alors de pouvoir, à l'aide de méthodes algorithmiques, déterminer les valeurs optimales que peuvent prendre ces paramètres non biologiquement accessibles. Cette étape de calibration de modèle est alors associée à la notion d'optimisation. Optimiser signifie trouver la combinaison optimale des valeurs des paramètres, autrement dit la meilleure solution (ou les meilleurs couples de solutions) possible au problème posé, par exemple la minimisation d'une fonction objective (Banga, 2008).

2. Étapes de calibration d'un modèle

Afin de déterminer la meilleure combinaison de paramètres possible, nous avons suivi un ensemble d'étapes (Figure 34).

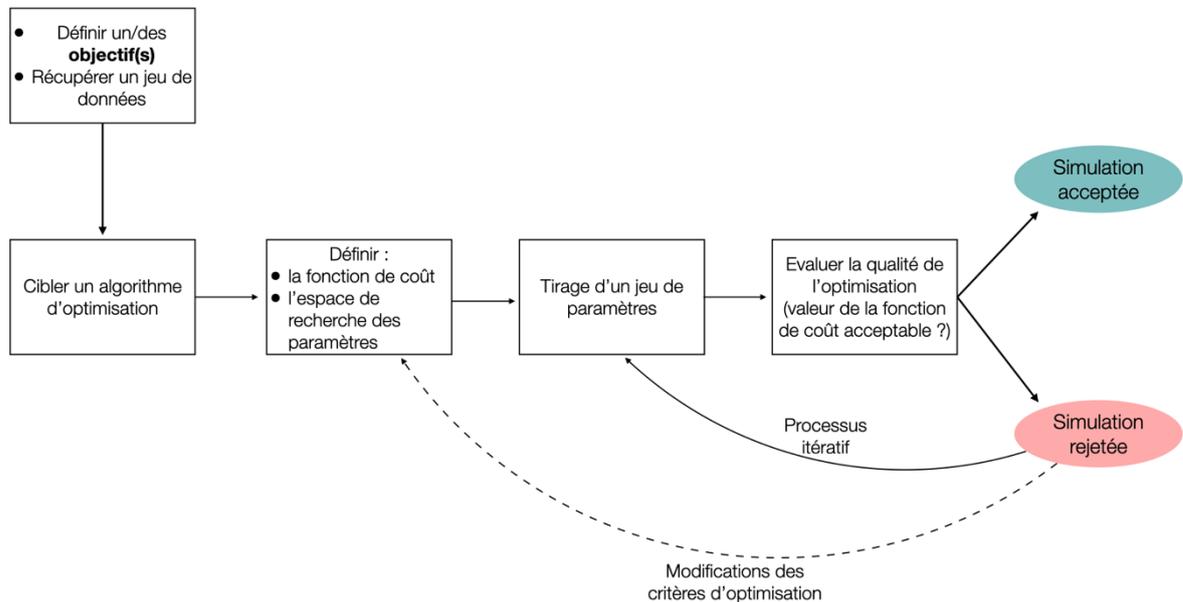


Figure 34. Schéma conceptuel des différentes étapes de calibration.

La calibration d'un modèle passe par plusieurs étapes clés jusqu'à la détermination d'une combinaison de paramètres validant notre critère de sélection (seuil d'erreur considéré comme acceptable).

L'estimation des paramètres d'un système est un processus bien souvent stochastique et itératif. Elle nécessite l'emploi d'un outil algorithmique permettant d'explorer un espace de recherche des paramètres afin de répondre à un problème posé.

La première étape est, à partir des données et des connaissances dont on dispose, de choisir un algorithme d'optimisation. Par la suite, une fonction de coût est définie. Celle-ci permet de définir le critère de recherche de la meilleure combinaison de paramètres qui minimise (ou maximise en fonction du problème posé) l'écart entre les données simulées et les données biologiques. Ensuite, un espace de recherche pour chaque paramètre est défini. L'algorithme procèdera à un tirage d'une combinaison de paramètres qu'il évaluera à l'aide de la fonction de coût. Si cet ensemble de paramètres ne permet pas de générer une simulation acceptable, celui-ci est alors rejeté et l'algorithme tirera un nouvel ensemble de paramètres.

B. Algorithmes d'optimisation

1. Principes généraux

D'une façon générale, l'optimisation consiste à minimiser ou maximiser l'écart entre les données simulées issues de la résolution du modèle et les données biologiques. Que cela soit pour minimiser ou maximiser, la mesure de cet écart est évaluée à travers une fonction qui est dite fonction de « coût », ou fonction « objective », ou encore fonction de « *fitness* ». Cette fonction de coût est définie sous la forme :

$$f(x^*) = \min f(x) \quad (\text{fonction de minimisation})$$

$$f(x^*) = \max f(x) \quad (\text{fonction de maximisation})$$

Le problème considéré est de trouver un optimum x^* de la fonction f de telle sorte que :

$$\forall x \in \Theta \subseteq \mathbb{R}^n, f(x) \geq f(x^*) \quad (\text{pour une minimisation})$$

$$\forall x \in \Theta \subseteq \mathbb{R}^n, f(x) \leq f(x^*) \quad (\text{pour une maximisation})$$

Avec x un vecteur de dimension n et Θ désigne l'espace de recherche qui correspond à un intervalle de valeurs défini pour chaque paramètre. Ainsi, $x \in \Theta$ correspond à une combinaison de paramètres. L'objectif étant de déterminer la meilleure combinaison de paramètres x^* , autrement nommé « optimum global ». Cette fonction peut être soumise à des contraintes qui sont appliquées sur les paramètres afin de définir un espace d'exploration.

La métrique couramment utilisée afin de quantifier l'ajustement entre les données simulées et les données biologiques est l'erreur quadratique moyenne (ou MSE : « *Mean Squared Error* ») de la forme :

$$MSE = \frac{1}{n} \times \sum_{i=0}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (9)$$

Avec n le nombre de mesures, y_i les données simulées ou théoriques, et \hat{y}_i les données biologiques.

La détermination de l'optimum global fait généralement appel à des algorithmes d'optimisation. En fonction du problème d'optimisation posé, la détermination de l'optimum global peut être relativement facile. En effet, dans le cas où le modèle est composé d'un nombre de paramètres et de variables restreint, l'espace de recherche est simplifié avec une fonction objective pouvant être de forme convexe, ou unimodale (Figure 35 (B)). Dans ce cas donné, où imaginons qu'il n'existe qu'une seule solution au problème posé, la recherche des valeurs optimales des paramètres est facilement déterminée. En revanche, lorsque le nombre de paramètres du modèle augmente, la fonction objective gagne en complexité et peut prendre des formes particulières (Figure 35 (A)). On associe cette complexité à la notion de paysage adaptatif (ou « *fitness landscape* ») (de Visser and Krug, 2014; Stadler and Happel, 1999). Dans le cas où la fonction objective présente plusieurs optima, la recherche de l'optimum global (la solution optimale au problème posé) devient complexe. En effet, l'algorithme d'optimisation peut être attiré par une zone « d'attraction », ou de convergence, qui correspond bien souvent à un optimum local. Cette difficulté à trouver les valeurs optimales des paramètres est souvent accompagnée par une augmentation considérable du temps de calcul et un risque de trouver une solution qui corresponde à un optimum local. Par ailleurs, il reste difficile de garantir que la solution trouvée correspond bien à l'optimum global.

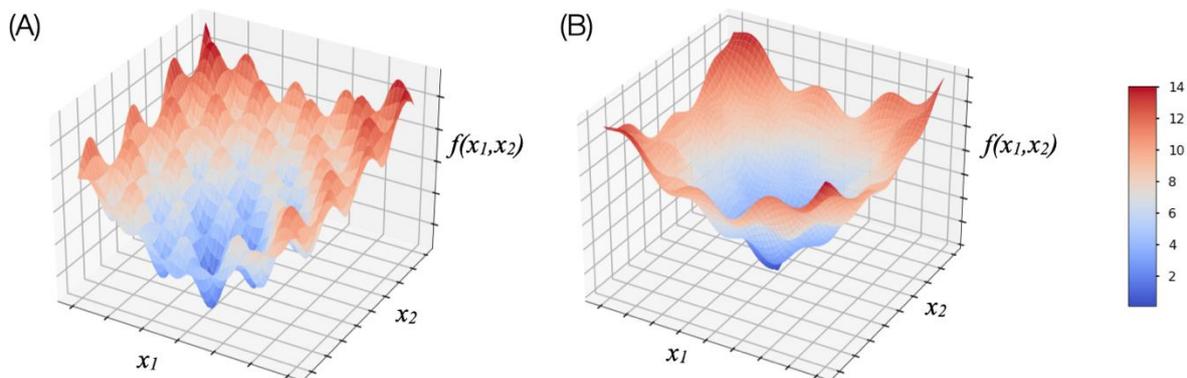


Figure 35. Illustration des solutions de deux fonctions objectives.

Exemple simple d'une représentation en 3D de l'espace de recherche de la fonction coût pour deux paramètres x_1 et x_2 . En fonction du problème posé (minimisation de la fonction objective associée à une valeur faible, en bleu, ou maximisation associée à une valeur élevée en rouge), les solutions peuvent être difficiles à déterminer (A). En effet, dans ce cas plusieurs valeurs de minima locaux coexistent ce qui peut complexifier la tâche de l'algorithme d'optimisation. Dans le second cas (B), l'espace de recherche est moins complexe de forme convexe, ce qui facilite le problème d'optimisation.

L'optimisation se complexifie lorsque l'espace de recherche associé pour chaque paramètre augmente. En effet, l'utilisation d'algorithmes d'optimisation permettant de résoudre le problème posé (minimisation ou maximisation de la fonction coût), nécessite d'imposer un intervalle de valeurs pour chaque paramètre du modèle à optimiser. Par conséquent, en fonction du nombre de paramètres du modèle et des connaissances *a priori* quant à l'intervalle de valeurs donné, le problème peut s'avérer complexe à résoudre.

L'optimisation globale est un domaine de recherche à part entière. Le choix de la méthode la plus adaptée doit tenir compte de différents paramètres comme la complexité du modèle, le nombre de données disponibles et le nombre de paramètres. Plusieurs stratégies et démarches existent pour aider à la calibration de modèles mathématiques (Villaverde *et al.*, 2022). Parmi ces méthodes on trouve par exemple les méthodes d'échantillonnages (approches bayésiennes, ou l'échantillonnage par hypercube latin) (Bianconi *et al.*, 2020), ou encore les méthodes utilisant des algorithmes d'optimisation.

2. Algorithmes d'optimisation

Les algorithmes d'optimisation peuvent être catégorisés en deux grandes classes : 1) les algorithmes d'optimisation globale ; 2) les algorithmes d'optimisation locale.

a. Algorithme d'optimisation locale

Les algorithmes d'optimisation locale, *a contrario* des algorithmes d'optimisation globale, ont pour objectif de trouver la meilleure solution sur un espace de recherche défini. Ces algorithmes sont particulièrement adaptés lorsque le problème posé repose sur des connaissances précises sur les bornes appliquées à chaque paramètre. A partir d'une solution initiale, la recherche locale permet d'explorer, en fonction d'un pas de temps défini, l'espace de recherche jusqu'à converger vers la solution optimale. Ainsi, l'idée de contraindre l'espace de recherche, permet à ces algorithmes une convergence rapide vers la solution optimale. Parmi ces algorithmes d'optimisation locale on trouve notamment :

- l'algorithme du **gradient** (ou la descente de gradient) : l'optimisation par descente de gradient fait partie des approches couramment rencontrées dans le domaine de l'optimisation (Venter, 2010). Celui-ci permet de minimiser la fonction de coût $f(x^*)$, composée par un ensemble de paramètres, en mettant à jour les paramètres dans la direction opposée du gradient (Ruder, 2017). Le gradient correspond au vecteur qui caractérise la

variabilité de la fonction coût au voisinage du point défini. Il permet de déduire la direction où la fonction croît le plus. Ainsi, c'est un algorithme itératif qui évalue la fonction en chaque point successif et se stabilise jusqu'à trouver le minimum (Figure 36). Cet algorithme est particulièrement efficace lorsque la fonction est convexe.

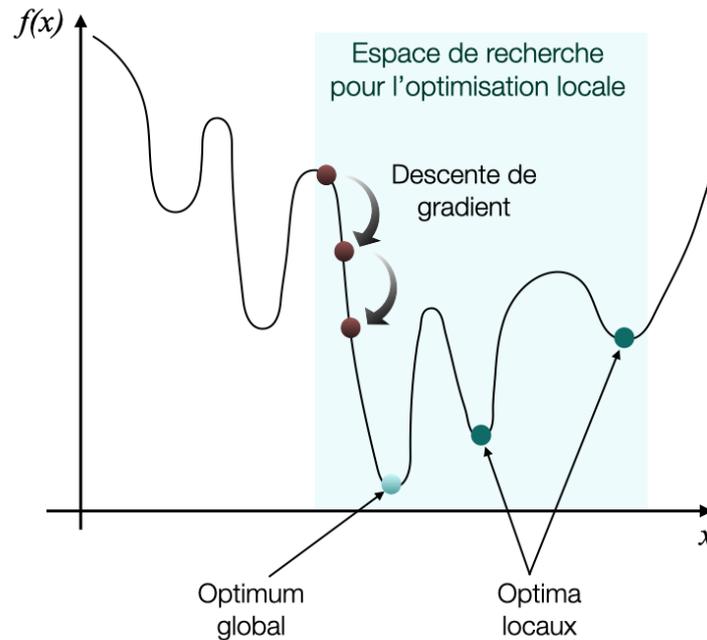


Figure 36. Illustration du principe de descente de gradient.

L'algorithme de descente de gradient évalue le gradient de la fonction coût $f(x)$ par rapport à la valeur du paramètre x jusqu'à trouver le minimum de la fonction.

- l'algorithme de **Levenberg-Marquardt** : développé dans les années 1944, cet algorithme est parfaitement adapté pour résoudre des problèmes non linéaires des moindres carrés (Ranganathan, 2004; Moré, 1978). C'est un des algorithmes les plus utilisés pour des problèmes d'optimisation locale. Il considère le problème de minimisation de la fonction de la somme des carrés des erreurs (mesure de l'écart entre les données simulées et les données biologiques) défini sous la forme :

$$f(x) = \frac{1}{2} \sum_{j=1}^m r_j^2(x) \quad (10)$$

avec $x = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ un vecteur (vecteur de paramètres du modèle), r_j est la fonction de forme \mathbb{R}^n à \mathbb{R} , enfin r_j correspond au résidu (ou l'erreur).

b. Algorithme d'optimisation globale

Les algorithmes d'optimisation globale ont pour objectif de converger vers un optimum global au problème posé. Ces algorithmes ne requièrent pas un espace de recherche restreint pour chaque paramètre. Par conséquent ils sont préférentiellement utilisés lorsque les valeurs des paramètres sont inconnues et que l'espace de recherche appliqué pour chaque paramètre est élevé. En fonction du nombre de paramètres et de l'espace de recherche défini, l'espace de recherche peut alors être complexe et comprendre plusieurs optima locaux. La principale contrainte sur l'utilisation de ces algorithmes est qu'ils peuvent converger vers des optima locaux qui ne permettent pas toujours de produire des solutions cohérentes avec les observations biologiques. De plus, ces solutions peuvent être éloignées de la solution optimale vers laquelle il aurait fallu converger.

L'estimation des valeurs des paramètres à partir de données biologiques peut s'avérer être une tâche complexe. La méthodologie de calibration doit répondre à plusieurs critères : la rapidité d'évaluation de la fonction de coût, la robustesse de l'algorithme d'optimisation à explorer tout l'espace de recherche et sa capacité à converger rapidement vers la solution optimale (Ashyraliyev *et al.*, 2009).

Parmi ces algorithmes d'optimisation globale on trouve :

- le **recuit simulé** : cette stratégie stochastique, développée dans les années 1980, s'inspire de la physique statistique et tire son origine dans le domaine de la thermodynamique avec le processus physique de recuit des solides (Kirkpatrick *et al.*, 1983; Guilmeau *et al.*, 2021). Ce processus est décrit suivant deux étapes. La première consiste à augmenter la température du bain de chaleur jusqu'à ce que le solide fonde. Par la suite la température est abaissée progressivement jusqu'à ce que les particules se trouvent dans l'état fondamental du solide (Aarts *et al.*, 2005). Ainsi, cette méthode de recuit simulé explore, par itérations successives, le paysage adaptatif de la fonction coût jusqu'à converger vers le minimum absolu. En gardant cet exemple de thermodynamique, la recherche de l'optimum global démarre avec un état initial du solide caractérisé par une énergie E_1 . Un état ultérieur est généré après perturbation de l'état initial caractérisé par une énergie E_2 . L'énergie de cet état ultérieur est alors comparée avec l'énergie de l'état initial. Si la différence est inférieure ou égale à 0 ($E_2 - E_1 \leq 0$), alors le nouvel état généré est conservé. La méthode de recuit simulé repose sur les distributions de Boltzmann. La probabilité du système d'avoir une énergie E à une température T est proportionnelle à la constante de Boltzmann.

Ainsi, cette méthode permet, sur un processus d'itération, d'évaluer la fonction de coût sur une suite de points « proches », et tolère avec une probabilité définie une remontée dans la fonction de coût. Cette stratégie permettrait de sortir d'un optimum local.

- Les algorithmes, **évolutionnaires** ont largement montré leur capacité à résoudre des problèmes d'optimisation dans les sciences (Kumar *et al.*, 2010; Katoch *et al.*, 2021). Ils sont notamment définis comme des méthodes métaheuristiques, c'est-à-dire qu'ils sont basés sur une approche mathématique itérative et stochastique dont l'objectif est de converger vers un optimum global de la fonction (Osman and Kelly, 1997).

Ces algorithmes évolutionnaires sont inspirés de la biologie, et plus particulièrement de la théorie de l'évolution de Charles Darwin datant du XIX^{ème} siècle. Cette théorie repose sur le principe de croisement génétique, de mutations génétiques, et de sélection naturelle, participant à renouveler la population et faire en sorte que chaque individu soit unique (Figure 37).

Les algorithmes génétiques reposent sur ce même principe selon lequel une sélection des meilleurs individus est effectuée en fonction du problème posé (valeur de la fonction coût), après croisements et mutations sur le génome de la population initiale. Par analogie, un individu correspond à une combinaison de paramètres (ou solution), le génome est associé à un paramètre du modèle. Enfin, la population comprend l'ensemble des individus, c'est-à-dire l'ensemble des différentes combinaisons de paramètres générés durant une génération. La première étape consiste à la génération aléatoire d'un ensemble d'individus constituant la population. Ces individus sont alors classés en fonction des solutions de fitness associées. Cette valeur de fitness détermine le devenir de chaque individu. Les meilleurs individus sont retenus et voient leur génome être modifié suivant deux mécanismes. Le premier correspond au croisement, il sélectionne aléatoirement deux individus (les parents) parmi les individus sélectionnés, et effectue un échange des « portions » de leur génome. Ainsi un nouvel individu, couramment désigné comme l'« enfant », est formé. Le second mécanisme de modification des individus est la mutation. De manière similaire à la biologie, la mutation consiste en la modification aléatoire d'un gène du génome selon une probabilité (taux de mutation). Ainsi, le nouvel individu formé (l'enfant) possède un génome unique partageant des caractéristiques communes avec les parents qui ont été retenus.

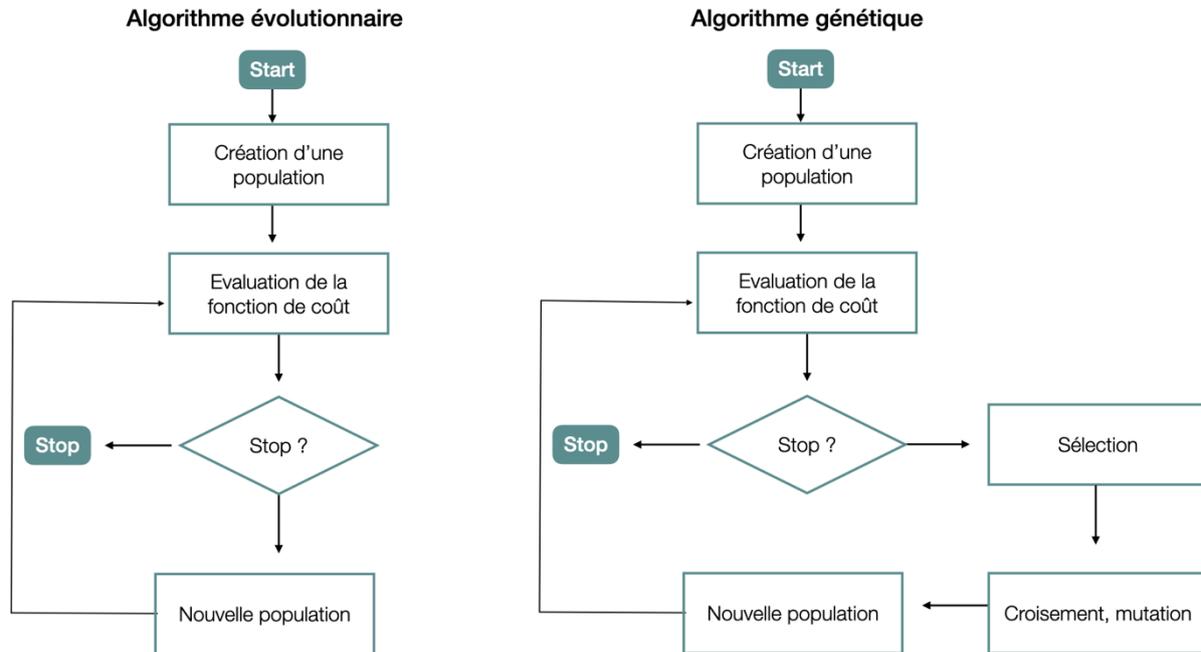


Figure 37. Principe général des algorithmes évolutionnaires et génétiques.

Ces algorithmes s'inspirent de la théorie de l'évolution retrouvée en biologie, dans l'objectif de résoudre des problèmes d'optimisation complexes. Une population initiale est évaluée avec la fonction de coût. Suivant un processus itératif, une nouvelle population est générée afin de sélectionner les meilleurs individus répondant au problème posé. Les algorithmes génétiques utilisent spécifiquement des opérateurs de croisement et de mutation pour générer cette nouvelle population.

Problématique scientifique

La réponse inflammatoire est essentielle à la réparation tissulaire, dont l'efficacité diminue avec l'âge. Il est largement admis dans la littérature que les macrophages jouent un rôle déterminant au cours de cette réponse, *via* leurs fonctions pro- et anti-inflammatoires. Par ailleurs, les macrophages présents au cours de cette inflammation proviennent de deux origines distinctes : les macrophages résidents et ceux dérivés des monocytes circulants. L'étude du rôle de chacune de ces sous-populations n'est encore que peu explorée à ce jour, notamment à cause des limites technologiques en biologie.

Le travail réalisé au cours de cette thèse se base sur l'hypothèse selon laquelle **les macrophages résidents sont nécessaires à la résolution de la réponse inflammatoire dans un contexte de lésion tissulaire. L'altération de la réparation tissulaire observée au cours du vieillissement pourrait être due à une perte de ces macrophages résidents et/ou de leurs fonctions pro-résolutives.**

L'objectif de cette thèse a été de développer un modèle *in silico* dans le but :

- de reproduire la dynamique de la réponse inflammatoire à la suite d'une lésion tissulaire chez le mammifère adulte,
- d'intégrer la dynamique et le rôle des deux sous-populations distinctes de macrophages,
- d'évaluer les paramètres clés conduisant à une inflammation chronique.

Partie II. Travaux de thèse : mise au point d'un modèle mathématique de la réponse inflammatoire

“Let theory guide your observations”

(Charles Darwin, 1863)

Du réseau bayésien aux équations différentielles

Les approches de modélisation sont nombreuses. Nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur l'utilisation des réseaux bayésiens comme outil de modélisation. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 3 de l'introduction, le réseau bayésien est un outil qui présente de nombreux avantages. Cette approche de modélisation nous a semblé être un outil prometteur et adapté à notre problématique, notamment de par sa possibilité d'intégrer des connaissances *a priori* et *a posteriori*. Le réseau bayésien permet une représentation intuitive des connaissances qui peuvent être incertaines et le raisonnement à partir d'informations incomplètes. Sa représentation qualitative intuitive permet notamment de faciliter les échanges entre les biologistes et les modélisateurs. L'objectif était de développer un réseau probabiliste sur la réparation tissulaire afin d'être en mesure de pronostiquer l'issue de cette réparation tissulaire (régénération, cicatrisation, fibrose) et de diagnostiquer les évènements précoces pouvant conduire à une issue délétère de cette réparation. De plus, cette approche probabiliste permet l'ajout d'incertitude (épistémique, aléatoire ou de mesure) sur les relations causales entre chaque évènement, ce qui est particulièrement intéressant pour la description d'un mécanisme biologique en intégrant la variabilité inter-individuelle.

Un réseau bayésien est par définition un modèle statistique qui utilise la théorie de Bayes. Cependant, c'est une approche statique qui ne prend pas en compte l'évolution temporelle et notamment les boucles de rétroaction qui sont courantes en biologie. Nous avons donc dû évoluer vers un réseau bayésien dynamique qui permet d'intégrer la notion du temps.

L'une des contraintes de l'utilisation des réseaux bayésiens est la quantité de données nécessaire pour générer un réseau robuste avec des prédictions fiables. En effet, la robustesse et la validité d'un modèle tiennent en partie à sa capacité à intégrer et reproduire des observations réelles. Or, nous avons choisi de nous baser sur des données obtenues au laboratoire, sur un modèle *in vivo*. Non seulement ces données sont en quantité limitée, du fait de l'utilisation d'un modèle animal, mais nous n'avons également pas à notre disposition toutes les mesures à tous les temps de cinétique.

Nous avons donc remis en cause l'approche de modélisation et cherché une approche alternative pertinente permettant de répondre aux objectifs posés. L'état de l'art sur les principaux outils de modélisation *in silico* (présenté dans l'introduction de ce manuscrit) m'a amenée à explorer les avantages et limites des différentes approches. Nous nous sommes alors orientés sur les modèles dynamiques.

Cette approche permet de modéliser des dynamiques d'évolution de populations cellulaires au cours du temps de façon continue. L'utilisation de systèmes d'équations différentielles requiert des connaissances quant à l'évolution du système au cours du temps. Nous disposons de données numériques limitées mais également des connaissances d'expertise qualitatives, qui permettent de décrire l'évolution des différentes populations cellulaires au cours de la réponse inflammatoire.

La modélisation basée sur les systèmes différentiels se situe à l'échelle de la population. Il semble plus aisé de débiter l'exploration des rôles distincts des deux sous-populations de macrophages en tenant compte de l'évolution des populations, plutôt qu'à une échelle cellulaire. En effet, cette dernière nécessite des connaissances plus spécifiques décrivant le comportement de chaque agent dans son environnement. De plus, il existe de nombreux modèles basés sur l'utilisation de systèmes d'équations différentielles décrivant la réponse inflammatoire, bien que, à notre connaissance, la modélisation des sous-populations de macrophages n'a jamais été explorée *in silico*. L'étape de développement du modèle mathématique a permis de faire émerger de nombreuses réflexions afin de pouvoir proposer un modèle mathématique qui nous semble pertinent en ciblant les variables et les interactions biologiques clés. En effet, le phénomène biologique décrit dans l'introduction de ce manuscrit est un processus relativement complexe qui nécessite une simplification.

Chapitre 1. Construction du modèle mathématique de la réponse inflammatoire.

I. Démarche pour le développement d'un modèle mathématique

Afin de construire un modèle mathématique, reposant sur la conception d'un système basé sur des équations différentielles, nous avons suivi la démarche présentée ci-dessous (Figure 38).

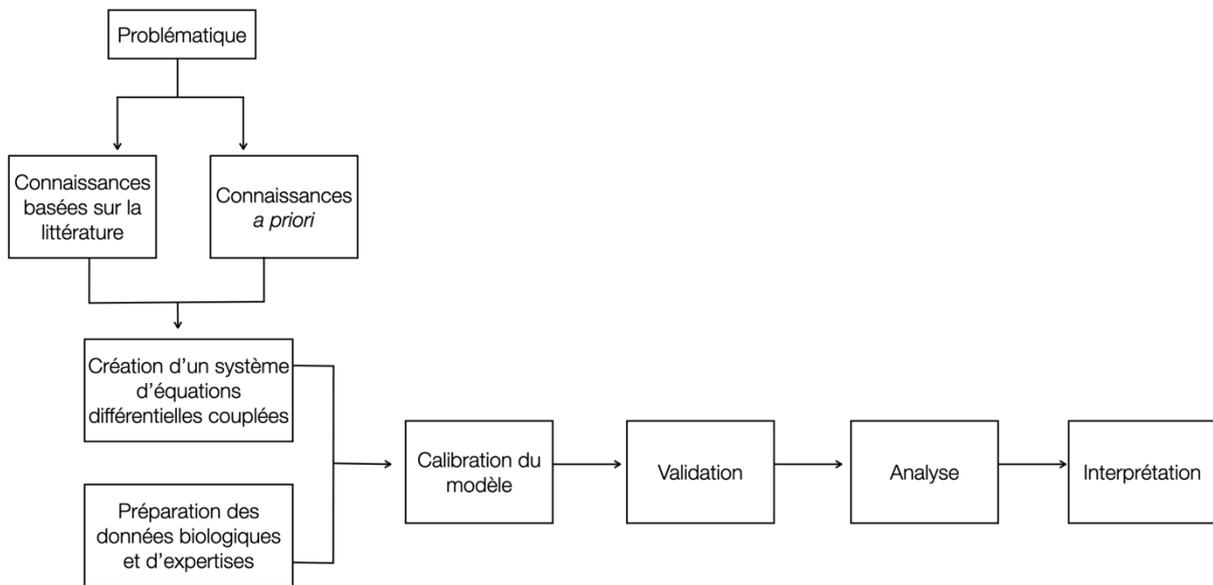


Figure 38. Représentation schématique de la démarche de construction d'un modèle mathématique.

La construction d'un modèle mathématique repose sur une première étape qui consiste à définir, *a priori*, les variables et les interactions biologiques clés à partir des connaissances issues de la littérature scientifique. Les variables correspondent aux différentes populations cellulaires, ou moléculaires, représentées dans le modèle. Les interactions biologiques doivent permettre de décrire l'évolution au cours du temps de chacune de ces populations. Le choix des variables ainsi que des interactions biologiques dépend essentiellement de la question biologique posée et du seuil d'abstraction acceptable pour répondre au mieux à la question scientifique posée. La seconde étape consiste à construire un système d'équations différentielles à partir des choix réalisés à l'étape précédente. L'étape qui suit consiste à valider le modèle mathématique

développé. C'est une étape dite de calibration qui confronte le modèle à des observations biologiques réelles, issues de travaux du laboratoire ou de données dites d'expertise. Cette étape doit permettre de déterminer l'ensemble des valeurs des paramètres du modèle qui sont initialement inconnus. La combinaison optimale de paramètres permet de générer un comportement du modèle fidèle aux observations biologiques. Cette étape de calibration est couramment associée à la notion d'optimisation, comme nous l'avons vu dans la partie introductive de ce manuscrit. La quatrième étape consiste à résoudre le système d'équations différentielles couplées avec la combinaison des valeurs des paramètres déterminées à l'étape précédente. La validation d'un modèle s'effectue en partie sur sa capacité à reproduire, et ainsi expliquer, les données et les observations biologiques. L'étape suivante consiste à analyser le modèle. Cette étape permet notamment d'évaluer la sensibilité de chaque paramètre composant le modèle. Enfin la dernière étape de ce modèle consiste à interpréter les résultats obtenus dans la phase précédente.

II. Construction du modèle mathématique

La modélisation d'un système biologique est un processus laborieux. Cela demande de prendre parti sur les hypothèses émises. Le principal défi pour l'étude des modèles mathématiques est la conception du modèle. Le modèle développé doit être cohérent avec les observations biologiques.

A. Choix des variables et des interactions biologiques

1. Contexte biologique

Pour rappel, nous nous plaçons dans un contexte de réparation tissulaire où la réponse inflammatoire est rapidement initiée. L'objectif de cette étude est de développer un modèle mathématique de cette réponse qui tient compte de la dynamique de deux populations distinctes de macrophages : les macrophages résidents initialement dans le tissu et les macrophages dérivés des monocytes qui sont recrutés au cours de la phase inflammatoire. Ces macrophages changent de phénotype au cours de la réponse inflammatoire. Ils passent d'une polarisation inflammatoire (M1) à un phénotype résolutif (M2).

2. Choix des variables

Dans un premier temps, nous avons cherché à développer un modèle basé sur les connaissances d’expertise, notamment sur des travaux réalisés au laboratoire sur un modèle de lésion du tissu adipeux chez la souris (Rabiller *et al.*, 2021). Ce travail a permis de mettre en évidence le rôle des neutrophiles et de leur éférocytose par les macrophages du tissu adipeux, dans un contexte inflammatoire. Nous avons donc intégré dans le modèle plusieurs variables clés, comme les neutrophiles, les neutrophiles apoptotiques, les monocytes, les macrophages inflammatoires ou encore les cytokines inflammatoires (Figure 39).

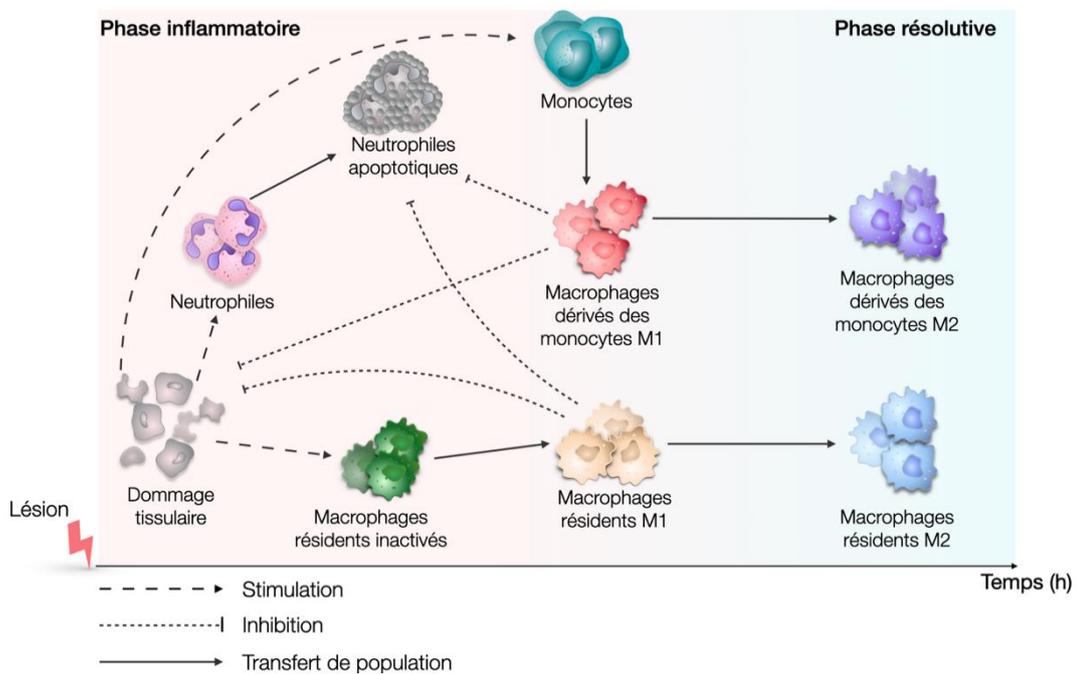


Figure 39. Représentation conceptuelle du modèle *in silico* de la réponse inflammatoire à neuf variables.

Ce modèle *in silico* décrit la dynamique de la réponse inflammatoire incluant le signal d’endommagement lié à la lésion tissulaire, l’afflux des neutrophiles et des monocytes au niveau du foyer inflammatoire, les neutrophiles apoptotiques, les macrophages résidents inactivés, les macrophages inflammatoires aux deux origines (résidents et dérivés des monocytes inflammatoire), puis les macrophages résolutifs résidents et issus des monocytes circulants.

Bien qu’il puisse sembler intéressant d’inclure dans le modèle la dynamique de plusieurs populations cellulaires, cela complexifie l’étape de calibration. En effet, le nombre de paramètres inconnus est plus important ce qui augmente le nombre de dimensions. De surcroît, la quantité limitée de données expose le modèle à des problèmes de « surapprentissage » (ou

« *overfitting* »), un terme couramment employé dans l'apprentissage machine (ou « *machine learning* »).

Dans ce contexte de données limitées, l'étape de calibration sur le modèle n'a pas pu aboutir à une estimation satisfaisante des paramètres. Un des moyens pour faciliter l'étape de calibration est de diminuer le nombre de paramètres du modèle (nombre de dimensions de l'espace de recherche).

Nous avons donc simplifié l'ensemble des acteurs moléculaires et cellulaires qui initient la réponse inflammatoire en un signal unique, que nous avons appelé signal inflammatoire associé au dommage tissulaire (D). Nous avons fait le choix de ne pas intégrer les neutrophiles comme variable dans le système d'équations, bien que l'importance de cette population cellulaire au cours de la réponse inflammatoire ait été largement décrite (Brostjan and Oehler, 2020; El Kebir and Filep, 2013; Fox *et al.*, 2010). Ce choix s'appuie sur certains modèles mathématiques publiés dans lesquels les neutrophiles ne sont pas modélisés. Cependant, afin de tenir compte de cette population cellulaire à minima, nous avons intégré conceptuellement les neutrophiles apoptotiques dans la variable D du modèle. Cette variable représente également les dommages cellulaires. Ainsi, cette variable n'est pas directement liée à une valeur biologique mesurable. Elle regroupe à la fois les cellules endommagées et le signal inflammatoire. Nous avons également choisi comme variables les deux populations de macrophages aux origines distinctes. Malgré le *continuum* de polarisation des macrophages qui est clairement admis dans la littérature scientifique, nous avons fait le choix de séparer, d'une part, les macrophages inflammatoires (M1), d'autre part, les macrophages résolutifs (M2). Cette représentation simplifiée des extrémités de la polarisation des macrophages permet, malgré tout, de mettre en exergue la dynamique de la réponse inflammatoire et ainsi de distinguer la phase inflammatoire de la phase résolutive. Par conséquent, les équations différentielles développées décrivent l'évolution au cours du temps des macrophages résidents inflammatoires (MR1) et des macrophages inflammatoires dérivés des monocytes circulants (MC1). Afin de représenter le changement phénotypique de ces macrophages inflammatoires en macrophages résolutifs, nous avons fait le choix d'établir une équation différentielle décrivant l'évolution des macrophages M2 totaux (résidents et issus des monocytes circulants). En effet, les données de la littérature indiquent que la distinction entre macrophages résidents et macrophages issus des monocytes circulants est essentielle au cours de la phase pro-inflammatoire, alors qu'au cours de la phase résolutive, la fonction de ces deux types de macrophages est plus proche. De plus, ce choix nous permettrait également de limiter le nombre de variables.

En résumé, nous avons ciblé quatre variables d'intérêt : les macrophages résidents inflammatoires (MR1) ; les macrophages inflammatoires issus des monocytes circulants (MC1) qui marquent la phase inflammatoire ; les macrophages résolutifs (M2) qui témoignent de la résolution de l'inflammation ; et enfin la variable « signal inflammatoire » lié au dommage tissulaire (D) qui permet d'initier la réponse inflammatoire.

Dans ce modèle, les macrophages résidents inflammatoires (MR1) et issus de la différenciation des monocytes (MC1) sont stimulés par l'endommagement tissulaire (D). Ces macrophages participent à la décroissance du signal inflammatoire, biologiquement expliqué, entre autres, par le mécanisme d'efférocytose. Cette efférocytose amorce le changement phénotypique des macrophages inflammatoires en macrophages pro-résolutifs (M2) (Figure 40).

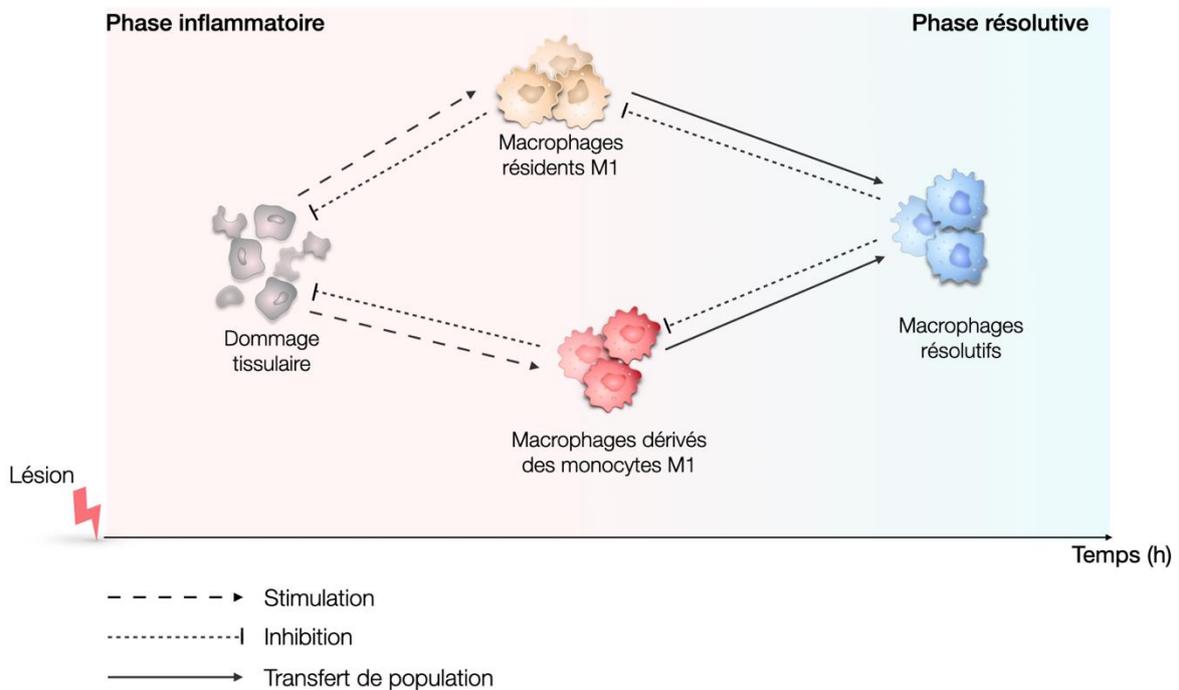


Figure 40. Représentation conceptuelle du modèle développé in silico de la réponse inflammatoire.

Ce modèle in silico de la réponse inflammatoire est composé de quatre variables : 1) le signal d'endommagement survenant suite à une lésion ; 2) les macrophages résidents inflammatoires ; 3) les macrophages dérivés des monocytes ; 4) les macrophages résolutifs.

B. Description des équations différentielles

1. Système d'équations différentielles couplées

Dans les étapes de construction du modèle, nous avons au préalable défini un contexte de modélisation : la construction des équations différentielles tient compte de la dynamique des différentes populations cellulaires et moléculaires, mais pas de l'aspect spatial afin de simplifier le modèle. Cela sous-entend que dans ce modèle chaque population est distribuée de manière homogène dans l'espace.

Le modèle vise à décrire l'évolution de chacune des variables de la phase initiale à la phase de résolution de l'inflammation, ce qui correspond à une durée estimée de 72 heures.

Les événements biologiques associés à cette réponse inflammatoire ne prennent en compte que des phénomènes localisés au niveau du site lésé (ou front de lésion) et non du tissu entier.

Par ailleurs, le modèle représente un contexte d'inflammation stérile (non associé aux pathogènes).

Afin de construire ce modèle mathématique de réponse inflammatoire, nous nous sommes basés sur le modèle de Torres et ses collaborateurs (chapitre 3 p. 96 de ce manuscrit). Ce modèle décrit notamment la dynamique des macrophages inflammatoires (M1) et résolutifs (M2) au cours de l'inflammation (Torres *et al.*, 2019).

Notre modèle est constitué à partir des équations différentielles ordinaires non-linéaires du premier ordre. Ce système permet de décrire l'évolution des populations de macrophages MR1, MC1 et M2 au cours d'une réponse inflammatoire médiée par un signal d'endommagement tissulaire (D) (Figure 41) :

$$\frac{dD}{dt} = i_1 \times MR1 + i_2 \times MC1 - s_2 \times D \times MR1 - s_4 \times D \times MC1 - s_5 \times D \times M2, \quad (11)$$

$$\frac{dMR1}{dt} = r_1 \times \frac{R_{m1MR}(t, D, MR1, MC1)}{x_5 + R_{m1MR}(t, D, MR1, MC1) + R_{m2MR}(t, M2)} - s_1 \times s_2 \times D \times MR1 - kd_1 \times MR1, \quad (12)$$

$$\frac{dMC1}{dt} = r_2 \times \frac{R_{m1MC}(t, D, MR1, MC1)}{x_6 + R_{m1MC}(t, D, MR1, MC1) + R_{m2MC}(t, M2)} - s_3 \times s_4 \times D \times MC1 - kd_2 \times MC1, \quad (13)$$

$$\frac{dM2}{dt} = s_1 \times s_2 \times D \times MR1 + s_3 \times s_4 \times D \times MC1 - kd_3 \times M2. \quad (14)$$

avec :

$$R_{m1MR}(t, D, MR1, MC1) = x_1 \times D(t) + x_2 \times MR1(t) + x_3 \times MC1(t)$$

$$R_{m2MR}(t, M2) = x_4 \times M2(t)$$

$$R_{m1MC}(t, D, MR1, MC1) = x_7 \times D(t) + x_8 \times MR1(t) + x_9 \times MC1(t)$$

$$R_{m2MC}(t, M2) = x_{10} \times M2(t)$$

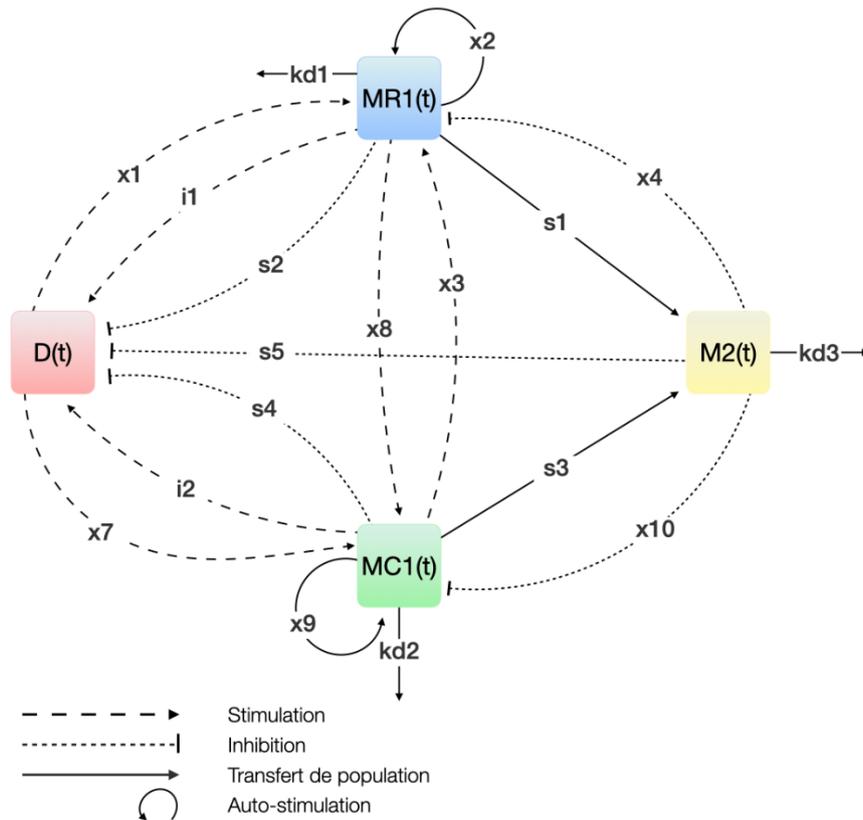


Figure 41. Représentation schématique du modèle proposé de la réponse inflammatoire.

Le modèle proposé décrit la dynamique de quatre variables : la variable (D) représentant le dommage cellulaire ; les macrophages inflammatoires résidents (MR1) et dérivés des monocytes circulants (MC1) qui sont stimulés par la variable (D) ; les macrophages résolutifs (M2) qui traduisent le changement phénotypique des macrophages inflammatoires au cours de la réponse inflammatoire.

a. Signal de danger : $D(t)$

La première équation permet de décrire la dynamique du signal inflammatoire associé au dommage tissulaire. Ce signal est un phénomène complexe qui intègre la présence des débris cellulaires (à l'instant initial) et l'activité inflammatoire (production de médiateurs inflammatoires) des macrophages MR1 et MC1. Nous supposons donc que les macrophages inflammatoires arrivant sur le site lésionnel produisent des médiateurs inflammatoires à une faible vitesse, i_1 et i_2 respectivement pour les MR1 et MC1, ce qui participe à alimenter ce signal de danger. Cette variable empirique n'étant pas associée à un marqueur biologique spécifique qui permettrait de la quantifier, elle est exprimée en unité arbitraire. Ce signal de danger décroît proportionnellement grâce au mécanisme d'efférocytose exercé par les macrophages résidents et circulants à un taux respectif de s_2 et s_4 . Nous avons choisi d'inclure l'activité anti-inflammatoire des macrophages résolutifs qui diminuent le signal de danger à un taux s_5 .

b. Macrophages résidents : $MR1(t)$

La seconde équation décrit la dynamique des macrophages résidents inflammatoires. Nous supposons que le recrutement des macrophages résidents MR1 sur le site lésionnel s'effectue suivant un état quasi-stationnaire exprimé par l'équation de Michaelis-Menten. L'équation de Michaelis-Menten, de type non-linéaire, implique une saturation du recrutement des MR1 qui ne peut pas être supérieur à r_1 (vitesse maximale de recrutement des MR1). Cela empêche la population de MR1 de croître indéfiniment. Nous avons ainsi conservé, et adapté, l'équation préalablement développée dans le travail de Torres et ses collaborateurs (Torres *et al.*, 2019). L'apparition de nouveaux MR1 est due, soit à l'activation de macrophages résidents présents sur le front de lésion et initialement non stimulés, soit à l'arrivée de macrophages résidents présents dans le reste du tissu et qui migrent vers le front de lésion en réponse aux différents médiateurs inflammatoires. On admet dans le modèle trois signaux qui stimulent le recrutement des macrophages résidents inflammatoires : 1) le signal de danger D qui induit le recrutement des MR1 à une vitesse x_1 ; 2) les signaux inflammatoires (cytokines, chimiokines entre autres) libérés par les macrophages dérivés des monocytes à une vitesse x_3 ; 3) les signaux inflammatoires libérés par les macrophages résidents déjà présents sur le front de lésion à une vitesse x_2 . Ces macrophages résidents sont capables d'effectuer l'efférocytose, participant ainsi à la diminution du signal d'endommagement tissulaire à un niveau s_2 . Il est également supposé

que les MR1 peuvent se différencier en macrophages résolutifs M2 à une vitesse s_1 qui est accélérée par le mécanisme d'efférocytose. De plus, nous supposons que la population des macrophages résidents décroît à une vitesse kd_1 . Cette décroissance pouvant être due à une apoptose cellulaire.

c. Macrophages dérivés des monocytes : MC1(t)

La troisième équation permet de décrire la dynamique des macrophages inflammatoires dérivés des monocytes circulants. Nous supposons que l'infiltration des macrophages dérivés des monocytes présente les mêmes propriétés que celle des MR1. Nous l'avons donc également décrite à l'aide de l'équation de Michaelis-Menten. Cette infiltration est notamment favorisée par : 1) le signal de dommage tissulaire (D) à un taux x_7 ; 2) l'activité des macrophages résidents pro-inflammatoires à un taux x_8 ; 3) l'activité des MC1 à un taux x_9 traduit par la production de cytokines et chimiokines entres autres. Ces macrophages dérivés des monocytes peuvent également effectuer l'efférocytose à un taux s_4 . Ce paramètre d'efférocytose amplifie le changement phénotypique des macrophages vers un phénotype M2 au cours de la réponse inflammatoire à un taux s_3 . Nous supposons qu'il existe, comme pour les macrophages résidents inflammatoires, une décroissance de cette population à la vitesse kd_2 pouvant être expliquée par une apoptose ou une émigration cellulaire.

d. Macrophages résolutifs : M2(t)

Cette dernière équation permet de décrire l'évolution au cours du temps de la population des macrophages résolutifs. Celle-ci est principalement due à un changement phénotypique des macrophages M1 (MR1 et MC1) en macrophages M2. En effet, nous supposons que sur la fenêtre de temps de trois jours, la principale source de macrophages résolutifs présents sur le site de lésion est la transition des macrophages pro-inflammatoires résidents et dérivés des monocytes pro-inflammatoires à un taux respectif $s_1 \times s_2$ et $s_3 \times s_4$. Ces macrophages résolutifs sont supposés décroître à la vitesse kd_3 . Cette disparition pouvant être expliquée par une apoptose ou une émigration cellulaire.

2. Analyse du modèle

a. Paramètres du modèle

Le système se compose de quatre équations différentielles couplées et de 22 paramètres. La description et les unités de chaque variable et paramètre sont données dans les tableaux qui suivent (Tableau 1 ; Tableau 2) :

Variables	Domaine théorique	Définition	Unités
$D(t)$	$[0, +\infty[$	Signal d'endommagement tissulaire	$D - unit$
$MR1(t)$	$[0, +\infty[$	Macrophages résidents inflammatoires	$Munit$
$MC1(t)$	$[0, +\infty[$	Macrophages inflammatoires dérivés des monocytes circulants	$Munit$
$M2(t)$	$[0, +\infty[$	Macrophages résolutifs	$Munit$

$Munit$: Million de cellules par gramme de tissu.

Tableau 1. Sommaire des variables utilisées dans le modèle.

Paramètres	Domaine théorique	Définition	Unités
i_1	$]0, +\infty[$	Signal i produit par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
i_2	$]0, +\infty[$	Signal i produit par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
kd_1	$]0, +\infty[$	Taux de décroissance de MR1	h^{-1}
kd_2	$]0, +\infty[$	Taux de décroissance de MC1	h^{-1}
kd_3	$]0, +\infty[$	Taux de décroissance de M2	h^{-1}
s_1	$]0, +\infty[$	Coefficient de <i>switch</i> de MR1 en M2	$Munit$
s_2	$]0, +\infty[$	Phagocytose par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
s_3	$]0, +\infty[$	Coefficient de <i>switch</i> de MC1 en M2	$Munit$
s_4	$]0, +\infty[$	Phagocytose par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
s_5	$]0, +\infty[$	Phagocytose par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_1	$]0, +\infty[$	Taux d'activation de MR1 par I	h^{-1}
x_2	$]0, +\infty[$	Taux d'auto-activation de MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_3	$]0, +\infty[$	Taux d'activation de MR1 par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_4	$]0, +\infty[$	Taux d'inhibition de MR1 par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_5	$]0, +\infty[$	Coefficient de Michaelis-Menten	h^{-1}
x_6	$]0, +\infty[$	Coefficient de Michaelis-Menten	h^{-1}
x_7	$]0, +\infty[$	Taux d'activation de MC1 par I	h^{-1}
x_8	$]0, +\infty[$	Taux d'activation de MC1 par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_9	$]0, +\infty[$	Taux d'auto-activation de MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_{10}	$]0, +\infty[$	Taux d'inhibition de MC1 par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
r_1	$]0, +\infty[$	Taux d'activation de MR1	$Munit \times h^{-1}$
r_2	$]0, +\infty[$	Taux d'activation de MC1	$Munit \times h^{-1}$

h : heure.

Tableau 2. Sommaire des paramètres utilisés dans le modèle.

b. Solutions du modèle

Après avoir proposé un modèle mathématique, la première question posée est celle de l'existence et de l'unicité des solutions. L'objectif est donc de savoir si chaque paramètre du modèle peut être déterminé. Nous avons re-écrit le modèle sous la forme :

$$\frac{dD}{dt}(t) = f_D(t, MR1, MC1, M2, D) \quad (15)$$

$$\frac{dMR1}{dt}(t) = f_{MR1}(t, MR1, MC1, M2, D) \quad (16)$$

$$\frac{dMC1}{dt}(t) = f_{MC1}(t, MR1, MC1, M2, D) \quad (17)$$

$$\frac{dM2}{dt}(t) = f_{M2}(t, MR1, MC1, M2, D) \quad (18)$$

Les fonctions f_D , f_{MR1} , f_{MC1} et f_{M2} sont de classe C^1 sur \mathbb{R}_+ (c'est-à-dire qu'elles sont dérivables de dérivée continue sur \mathbb{R}_+). En effet, les parties linéaires sont forcément C^1 ainsi que les fractions de Michaelis-Menten car leurs dénominateurs sont strictement positifs ($\geq x5$ ou $x6 > 0$). Donc, d'après le théorème de Cauchy-Lipschitz, chaque condition initiale est associée à une solution unique. De ce fait, on peut calculer les solutions correspondant à un jeu de paramètres.

État de stabilité du modèle

L'étude de l'état de stabilité du modèle montre que dans une condition physiologique sans inflammation, avec une valeur stable non triviale en M2, on constate l'apparition d'un point d'équilibre stable pour lequel le nombre de macrophages inflammatoires présents dans le système est nul. Cette observation est cohérente avec les observations biologiques.

En revanche, dans une condition physiologique et en absence de M2 : $f(0,0,0,0)$, on constate l'apparition d'un point d'équilibre pour lequel le nombre de MR1 et MC1 est non nul. Cela signifie que des macrophages inflammatoires (MR1 et MC1) sont présents dans le système dans une condition physiologique. Ce résultat n'est pas cohérent avec les observations biologiques et souligne que, dans une condition physiologique, la présence de macrophages M2 est nécessaire dans un tissu sain.

3. Conditions initiales du modèle

Le dommage tissulaire, en conditions stériles, induit un stress cellulaire et la libération immédiate d'un panel de médiateurs qui participent à l'initiation de la réponse inflammatoire. Par conséquent, nous avons supposé qu'à l'état initial la valeur de la variable (D) est non nulle et reflète l'évènement lésionnel du tissu. Comme l'indiquent les données du laboratoire, en condition initiale, les macrophages résidents inflammatoires (MR1) et ceux dérivés des monocytes circulants (MC1) ne sont pas présents dans le tissu au niveau du site lésionnel (Tableau 3). A l'état physiologique, on trouve cependant des macrophages résolutifs (M2).

Variabes	Domaine théorique	Condition initiale	Unités
$D(t)$	$[0, +\infty[$	4,200	$D - unit$
$MR1(t)$	$[0, +\infty[$	0,000	$Munit$
$MC1(t)$	$[0, +\infty[$	0,000	$Munit$
$M2(t)$	$[0, +\infty[$	0,499	$Munit$

$Munit$: Million de cellules par gramme de tissu.

Tableau 3. Conditions initiales du modèle.

Chapitre 2. Estimation des paramètres.

La modélisation *in silico* ne se limite pas au développement d'un modèle mathématique décrivant empiriquement le phénomène biologique. La robustesse et la fidélité d'un modèle *in silico* tiennent compte, en partie, de sa capacité à reproduire les observations biologiques. A cette fin, les valeurs inconnues des paramètres de notre modèle doivent être estimées afin de pouvoir reproduire et prédire les dynamiques des différentes variables. Cependant, la détermination d'une combinaison optimale de paramètres d'un modèle mathématique est une étape qui peut rapidement devenir laborieuse lorsque la quantité de données biologique est limitée.

I. Méthodologie de calibration

A. Données biologiques issues d'un modèle de lésion

Les 22 paramètres de notre modèle (voir chapitre 1 partie II p.121) sont inconnus. Les données utilisées pour la calibration sont des données produites au laboratoire provenant d'un modèle de réparation tissulaire (ablation partielle du tissu adipeux chez la souris C57BL/6 ; voir annexe) (Rabiller *et al.*, 2021). Cependant, les données disponibles sur les variables que nous avons ciblées dans le modèle mathématique sont limitées. Nous disposons de quatre points de cinétique sur la quantification des macrophages inflammatoires (M1) et résolutifs (M2) (données figures 3.J. et 3.K. respectivement). Nous ne disposons cependant pas de données sur l'évolution au cours du temps des populations de macrophages résidents et dérivés des monocytes inflammatoires (variables MR1 et MC1). Pour rappel, la dernière variable du modèle mathématiques est la variable empirique D qui n'est associée à aucun marqueur biologique.

B. Méthodologies développées pour la vérification des équations différentielles

Tout au long du développement du modèle, le manque de résultats satisfaisants nous a conduits à poser plusieurs questions :

Question 1 : les équations différentielles permettent-elles de décrire le phénomène biologique ?

Question 2 : la stratégie de calibration est-elle adaptée ?

Afin de vérifier si le modèle est capable de décrire le mécanisme biologique, nous proposons d'utiliser un jeu de données complet, dit « d'expertise ». Ces données sont construites à partir d'une régression des données biologiques (notamment des macrophages M1 et M2), couplées à des connaissances *a priori* de la réponse inflammatoire. L'utilisation d'un jeu de données complet décrivant la dynamique attendue pour chaque variable du modèle nous a permis de nous guider dans l'étape de développement du modèle mathématique. Cette stratégie permet de vérifier s'il existe au moins un ensemble de paramètres capable de reproduire le mécanisme biologique étudié.

1. Données d'expertises

a. Variable $D(t)$

Pour rappel, cette variable représente le signal d'endommagement du tissu à la suite d'une lésion. Nous avons fixé de façon arbitraire cette valeur à 4,2 D-Unit (chapitre 1 partie II p.123). Nous supposons que ce signal d'endommagement décroît tout au long de la réponse inflammatoire. Cette décroissance est notamment expliquée par l'activité des cellules immunitaires qui participent à la résolution de la réponse inflammatoire (voir chapitre 2 partie I).

b. Variables $MR1(t)$ et $MC1(t)$

Nous ne disposons pas de données sur l'évolution des populations de macrophages résidents et dérivés des monocytes circulants au cours de la réponse inflammatoire. Cependant, dans le modèle d'étude, nous disposons des données sur la dynamique des macrophages inflammatoires totaux (CD11c+ ; figure 3.J, groupe « NaCl », de l'annexe). Ainsi, afin de modéliser distinctement les macrophages inflammatoires, qu'ils soient résidents ou dérivés des

monocytes, nous considérons que la somme de ces deux populations inflammatoires correspond, à chaque point de cinétique, aux données biologiques des macrophages inflammatoires totaux (CD11c+).

A partir de l'état de l'art (chapitre 2 partie I), nous supposons que les macrophages résidents sont rapidement recrutés (migration des macrophages du tissu vers le foyer inflammatoire que nous modélisons) et acquièrent un profil inflammatoire. Les macrophages dérivés des monocytes circulants sont recrutés plus tardivement.

c. Variable M2(t)

La construction des données d'expertise de la variable M2 repose sur une interpolation des données dont nous disposons (voir Annexe, figure 3.J). De manière similaire aux données de cinétique précédentes, nous avons interpolé ces données d'expertise (Figure 42).

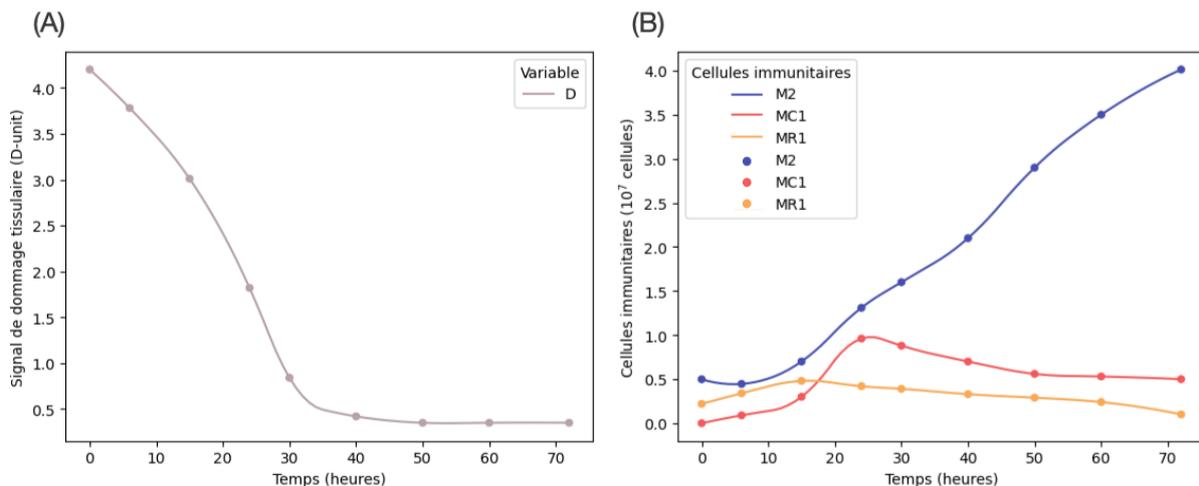


Figure 42. Données d'expertise.

Ces données d'expertise ont été construites à partir des données biologiques (voir annexe) et des connaissances a priori de la réponse inflammatoire. Nous avons par la suite réalisé une interpolation de ces données d'expertise.

2. Stratégie de calibration sur les équations différentielles couplées

Pour l'estimation des paramètres, nous avons utilisé l'algorithme évolutionnaire d'optimisation globale CMA-ES (« *Covariance Matrix Adaptation Evolution Strategy* »). Cet algorithme, proposé en 1990, fait partie des algorithmes évolutionnaires stochastiques inspiré par la théorie de l'évolution (Hansen and Ostermeier, 1996). Cette stratégie se base sur

l'adaptation de la matrice de covariance (Igel *et al.*, 2007). Le problème à optimiser est caractérisé comme une boîte noire, avec des paramètres en entrée et la valeur de la fonction coût en sortie. Cet algorithme est particulièrement adapté pour les problèmes non linéaires (ou non convexes) dont l'objectif est d'explorer l'espace des solutions en convergeant efficacement vers la meilleure solution, ce qui réduit le temps de calcul (Hansen *et al.*, 2003). L'algorithme CMA-ES est principalement utilisé dans les problèmes pour lesquels un seul objectif est défini. Dans notre cas, l'objectif défini est la minimisation de l'erreur entre les données simulées et les données d'expertise. La librairie DEAP sur Python a été utilisée pour lancer l'optimisation (Fortin, 2012). Afin d'évaluer l'erreur entre les données simulées et les données d'expertise, nous avons utilisé la métrique de l'erreur absolue moyenne, ou MAE (« *Mean Absolute Error* ») :

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\hat{y}_i - y_i| \quad (19)$$

où \hat{y}_i correspond aux données d'expertise, y_i aux données simulées et n au nombre de mesures. L'erreur est calculée sur les quatre cinétiques. Cependant, ces cinétiques ont des amplitudes différentes ce qui peut induire un biais dans le calcul de la MAE en faveur des cinétiques qui ont les valeurs les plus élevées. Nous avons ainsi adapté cette métrique en normalisant par rapport au maximum de chaque cinétique :

$$err = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{\hat{y}_i - y_i}{\hat{y}_{max}} \right| \quad (20)$$

avec \hat{y}_{max} la valeur maximale de chaque cinétique des données d'expertise.

Pour la calibration de notre modèle, nous avons défini un espace de recherche commun et plausible pour chacun des paramètres (0,10), à l'exception des paramètres kd où nous estimons que les phénomènes de disparition (apoptose, émigration cellulaire) exprimés par ces paramètres sont relativement faibles (borne maximale fixée à 0.5). En effet, sur une durée de modélisation de 72 heures, nous considérons que le taux de décroissance est relativement faible. Nous avons également fixé une borne supérieure faible pour les paramètres i représentant le signal inflammatoire produit par les macrophages (borne maximale fixée à 0.5). En effet, la

variable D n'étant associée à aucun marqueur biologique défini, nous supposons que cette variable dépend principalement de l'évènement déclencheur de la réponse inflammatoire.

La valeur de la borne supérieure a été fixée sur la base de travaux publiés (Day *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2019), de nombreux tests effectués et d'*a priori* sur le mécanisme biologique.

3. Résultats de simulations

a. Calibration CMA-ES sur les données biologiques

La calibration de notre modèle avec l'algorithme CMA-ES à partir des données biologiques n'a pas conduit à l'obtention d'un jeu de paramètre optimal. Nous avons utilisé la fonction de coût pour minimiser l'écart entre les données biologiques des M2 et des M1, par rapport aux données simulées (la somme de MR1 et MC1 doit correspondre aux données des M1).

Le résultat de calibration (Figure 43) montre un recrutement important des MR1 par rapport aux MC1. Or, il est largement établi dans la littérature qu'en condition inflammatoire, la population des macrophages dérivés des monocytes circulants devient largement majoritaire par rapport aux macrophages résidents. De plus, le nombre de M1 dans la simulation (somme des MR1 et MC1) est bien supérieure aux valeurs des données biologiques. On constate que le signal d'endommagement décroît rapidement avant-même l'arrivée des cellules du système immunitaire au niveau du foyer inflammatoire. Cette observation interroge sur la pertinence biologique.

Bien que l'algorithme CMA-ES soit parvenu à fournir des paramètres permettant de correspondre aux données biologiques M2, il ne converge pas vers une solution qui permet de décrire le mécanisme biologique étudié. L'optimisation des paramètres en utilisant uniquement les données biologiques, ne permet donc pas d'obtenir un ensemble de paramètres cohérent.

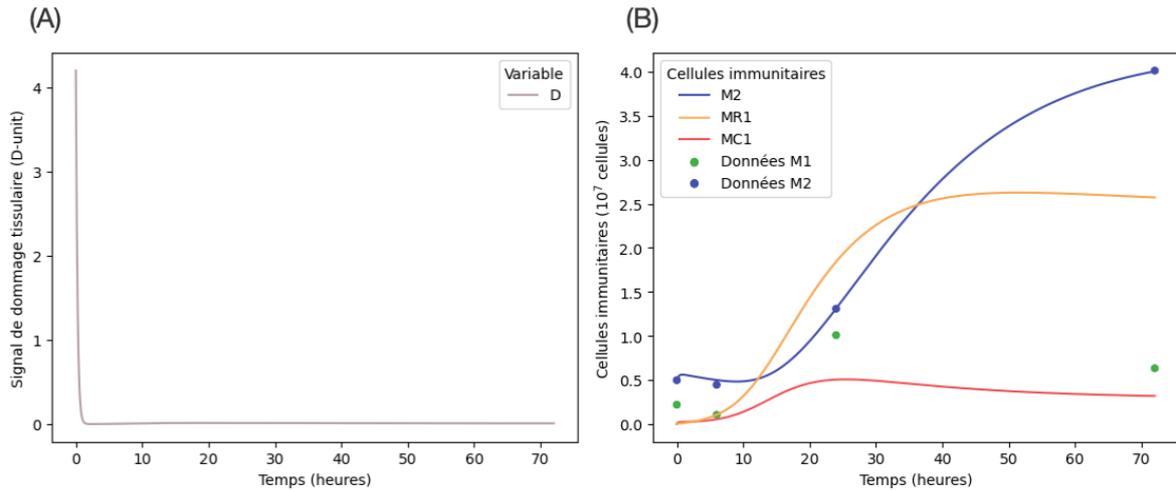


Figure 43. Optimisation de notre modèle avec l'algorithme mono-objectif CMA-ES sur les données biologiques.

Le panel (A) correspond à la prédiction du modèle pour la variable D , associée au dommage tissulaire et exprimée en D -unit. Le panel (B) correspond à la prédiction du modèle pour les variables $M2$ (macrophages résolutifs), $MR1$ (macrophages résidents inflammatoires) et $MC1$ (macrophages inflammatoires dérivés des monocytes). Les points correspondent aux données biologiques du laboratoire. La comparaison des données simulées avec les mesures expérimentales (données moyennes) est montrée pour les macrophages $M1$ et $M2$. Les données biologiques $M1$ sont comparées à la somme des macrophages $MR1$ et $MC1$.

b. Calibration CMA-ES sur les données d'expertise

i. Calibration sur modèle entier

La méthode de calibration ne fonctionne cependant pas toujours. Nous en avons fait l'expérience avec l'un de nos modèles complexes développés au début de ce travail. La calibration du modèle avec les données d'expertise n'a pas pu aboutir à des résultats satisfaisants (Figure 44). On observe notamment que les résultats de simulation des variables N (correspondant aux neutrophiles) et $M2$ ne suivent pas la cinétique des données d'expertise.

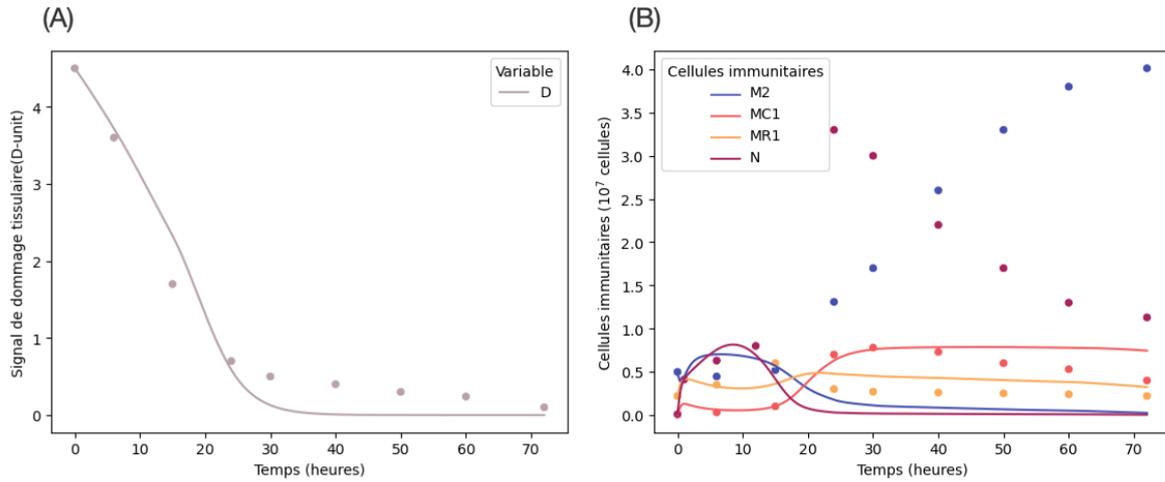


Figure 44. Calibration d'un modèle intermédiaire utilisant les données d'expertises.

Le panel (A) correspond à la prédiction du modèle pour la variable D , associée au dommage tissulaire et exprimée en D -unit. Le panel (B) correspond à la prédiction du modèle pour les variables $M2$ (macrophages résolutifs), $MC1$ (macrophages inflammatoires dérivés des monocytes), $MR1$ (macrophages résidents inflammatoires) et N (neutrophiles). Les points correspondent aux données d'expertise. L'erreur est mesurée entre les données d'expertise et les données de simulation. L'optimisation a été effectuée à l'aide de l'algorithme CMA-ES.

Cette stratégie de calibration par substitution de données biologiques avec les données d'expertise, ne permettait pas d'obtenir des jeux de paramètres satisfaisants.

Les différents résultats de calibration que nous avons obtenus ont remis en question les modèles développés au cours de ce travail. En effet, nous supposons que l'absence de solution optimale à notre problème après avoir fait tourner plusieurs fois l'algorithme en utilisant un jeu de données complet, est dû à l'incohérence entre les équations différentielles construites et les données d'expertise. La méthode a cependant permis la construction du modèle actuel.

La calibration de notre modèle à partir des données d'expertise a permis d'obtenir un jeu de paramètres cohérent avec les connaissances biologiques (Figure 45 ; Tableau 4). Ce résultat permet de mettre en avant la nécessité d'obtenir un jeu de données suffisamment complet.

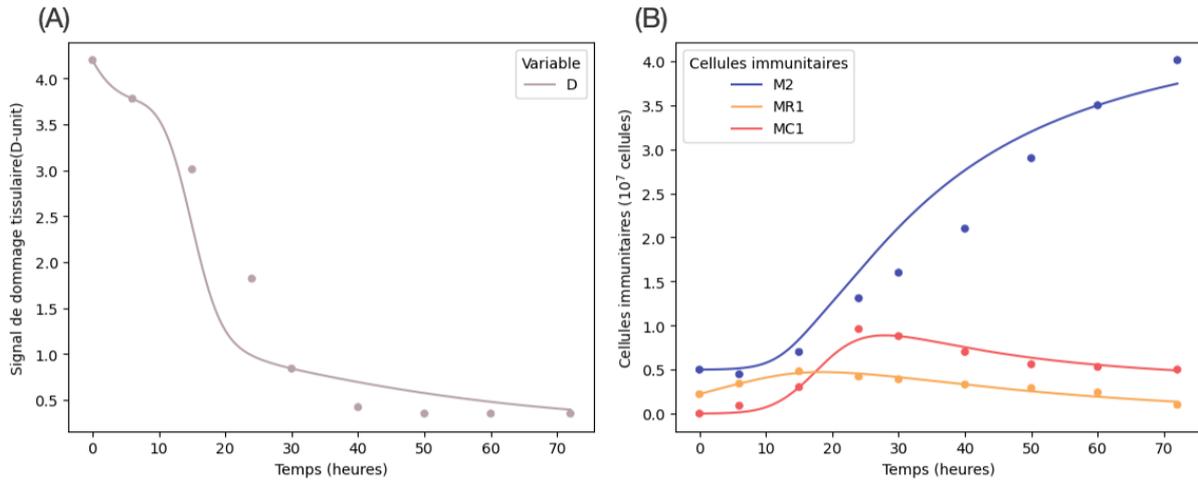


Figure 45. Optimisation de notre modèle avec l'algorithme mono-objectif CMA-ES sur les données d'expertise.

L'optimisation a été effectuée à l'aide de l'algorithme CMA-ES. Les points correspondent aux données d'expertise. L'erreur est mesurée entre les données d'expertise et les données de simulation. Le panel (A) correspond à la prédiction du modèle pour la variable D, associée au dommage tissulaire et exprimée en D-unit. Le panel (B) correspond à la prédiction du modèle pour les variables M2 (macrophages résolutifs), MR1 (macrophages résidents inflammatoires) et MC1 (macrophages inflammatoires dérivés des monocytes).

Paramètres	Bornes	Valeurs estimées	Définition	Unités
i_1	$[10^{-3}; 1]$	0,988	Signal i produit par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
i_2	$[10^{-3}; 1]$	0,540	Signal i produit par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
kd_1	$[10^{-3}; 0,5]$	0,055	Taux de décroissance de MR1	h^{-1}
kd_2	$[10^{-3}; 0,5]$	0,499	Taux de décroissance de MC1	h^{-1}
kd_3	$[10^{-3}; 0,5]$	0,001	Taux de décroissance de M2	h^{-1}
s_1	$[10^{-3}; 10]$	0,320	Coefficient de <i>switch</i> de MR1 en M2	$Munit$
s_2	$[10^{-3}; 10]$	0,003	Phagocytose par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
s_3	$[10^{-3}; 10]$	0,131	Coefficient de <i>switch</i> de MC1 en M2	$Munit$
s_4	$[10^{-3}; 10]$	0,814	Phagocytose par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
s_5	$[10^{-3}; 10]$	0,167	Phagocytose par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_1	$[10^{-3}; 10]$	0,132	Taux d'activation de MR1 par I	h^{-1}
x_2	$[10^{-3}; 10]$	3,538	Taux d'auto-activation de MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_3	$[10^{-3}; 10]$	0,003	Taux d'activation de MR1 par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_4	$[10^{-3}; 10]$	2,82	Taux d'inhibition de MR1 par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_5	$[10^{-3}; 10]$	0,169	Coefficient de Michaelis-Menten	h^{-1}
x_6	$[10^{-3}; 10]$	9,696	Coefficient de Michaelis-Menten	h^{-1}
x_7	$[10^{-3}; 10]$	0,001	Taux d'activation de MC1 par I	h^{-1}
x_8	$[10^{-3}; 10]$	0,001	Taux d'activation de MC1 par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_9	$[10^{-3}; 10]$	9,977	Taux d'auto-activation de MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_{10}	$[10^{-3}; 10]$	3,866	Taux d'inhibition de MC1 par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
r_1	$[10^{-3}; 10]$	0,075	Taux d'activation de MR1	$Munit \times h^{-1}$
r_2	$[10^{-3}; 10]$	1,552	Taux d'activation de MC1	$Munit \times h^{-1}$

h : heure / $Munit$: Million de cellules par gramme de tissu.

Tableau 4. Valeurs des paramètres estimées de notre modèle avec l'algorithme CMA-ES.

ii. Calibration sur une seule équation

Nous avons également testé la calibration du modèle en utilisant l'algorithme d'optimisation CMA-ES sur une seule équation du modèle à la fois dans l'objectif de vérifier si les équations différentielles sont capables de reproduire le mécanisme biologique. Cependant, notre modèle est constitué d'équations différentielles couplées. De ce fait, pour réaliser cette stratégie, nous devons substituer les valeurs calculées par les équations différentielles couplées par une régression des données d'expertise. Ainsi, cette approche permet de se focaliser sur la résolution d'une seule équation à la fois.

Théoriquement, cette méthode permet de simplifier l'espace de recherche et donc de converger plus rapidement vers une solution biologiquement cohérente. Cela permet de vérifier si chaque équation du modèle permet individuellement de reproduire les données d'expertise de l'équation en question. Cette approche n'a pas pour objectif de déterminer un jeu de paramètres optimal pour le modèle. De façon générale, cette approche permet de guider le concepteur du modèle mathématique en mettant en évidence les équations qui ne sont pas optimisées avec cette stratégie.

4. Conclusions

Cette méthodologie de calibration utilisant des données d'expertise a permis de guider la construction du modèle mathématique. Elle met en exergue qu'à partir d'un espace de recherche de 22 dimensions, il existe au moins une combinaison de paramètres permettant d'obtenir une dynamique correspondant aux observations biologiques attendues.

De manière générale, les modèles mathématiques permettent d'explorer des connaissances théoriques sur la compréhension d'un système à étudier (Caswell, 1988). Cependant, la validation par la donnée permet d'apporter de la robustesse au modèle. Dans notre cas, le modèle n'ayant pas été validé, on pourrait critiquer l'utilisation de ces données d'expertise. En effet, elles ne reposent pas sur des données biologiques expérimentales mais sur des connaissances *a priori*. L'utilisation de données d'expertise constitue donc une limite importante et non négligeable dans cette stratégie. Par conséquent, nous avons exploré une autre méthodologie de calibration n'utilisant pas ces données d'expertise.

C. Méthodologie de calibration avec des données limitées

Dans une partie des travaux scientifiques utilisant des modèles mathématiques, les valeurs des paramètres du modèle étudié sont issues de publications antérieures. Cette stratégie permet de simplifier l'étape de calibration. L'algorithme converge ainsi vers un jeu de paramètres optimal dans un temps de calcul raisonnable. Cependant, l'utilisation des valeurs de paramètres déjà publiées suggère que le modèle publié et celui en construction partagent tous deux un même contexte d'étude.

1. Description de la méthode de calibration

Dans ce travail, en l'absence d'une quantité de données suffisante pour l'estimation des paramètres, nous avons mis en place une fonction de coût s'appuyant sur des données quantitatives (données biologiques) et qualitatives (connaissances *a priori* formulées sous forme de « contraintes ») dans l'objectif de converger vers une solution optimale.

2. Test sur un modèle « benchmark »

a. Présentation du modèle

Dans ce travail nous avons utilisé un modèle mathématique publié dans la littérature afin de tester notre méthodologie. Le modèle d'Oliveira et ses collaborateurs est composé d'un système de cinq équations différentielles ordinaires couplées décrivant la dynamique de cicatrisation des plaies par un traitement à base d'huile-résine (modèle 2) (de Oliveira *et al.*, 2021) :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn}{dt} = \frac{\chi_n C}{\left(1 + \frac{g}{\beta_{gc}}\right)} - v \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} n, \end{array} \right. \quad (21)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{da}{dt} = vn \frac{\left(1 + \frac{g}{\beta_g}\right)}{\left(1 + \frac{c}{\beta_c}\right)} - \gamma_a a - \phi ma, \end{array} \right. \quad (22)$$

$$\frac{dm}{dt} = \chi_m c - \gamma_m m, \quad (23)$$

$$\frac{dc}{dt} = \alpha F(t) + k_n \left(\frac{n^2}{\beta_n^2 + n^2} \right) + \gamma_a k_a \left(\frac{a^2}{\beta_a^2 + a^2} \right) - \gamma_c c + km \left(\frac{m^2}{\beta_m^2 + m^2} \right), \quad (24)$$

$$\frac{dg}{dt} = k_g \phi ma - \gamma_g g, \quad (25)$$

où $n(t), a(t), m(t)$ représentent les différentes populations cellulaires, respectivement la population des neutrophiles apoptotiques, des neutrophiles activés et des macrophages. Les équations $c(t)$ et $g(t)$ représentent des médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. La fonction $F(t)$ est définie de la façon suivante : $F(t) = H(A\pi - \omega t)\sin^2(\omega t)$.

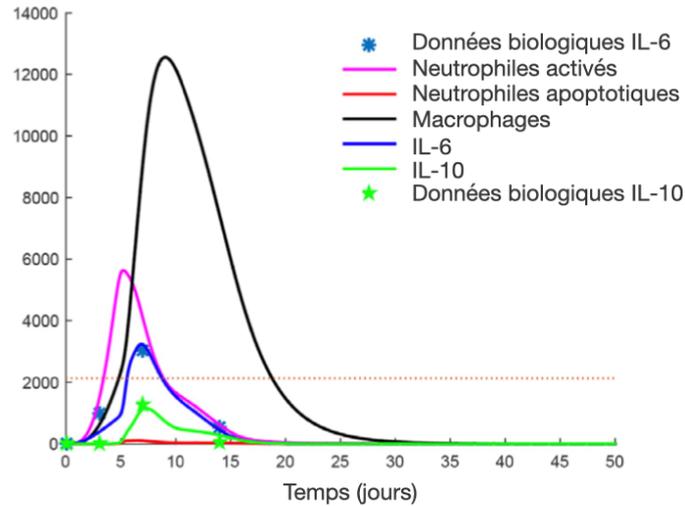


Figure 46. Dynamiques du modèle de benchmark (Oliveira et al., 2021).

Comportement du modèle benchmark de la cicatrisation des plaies par à un traitement à base d'huile-résine. Ce résultat est issu de la figure 3(a) de Oliveira et ses collaborateurs (2021) « *Mathematical modelling, parameter estimation and computational simulation for skin wound healing under Copaiferalangsdorffi treatments* » *Computer Methods and Programs in Biomedecine*.

b. Méthodologie de calibration

Le problème d'optimisation consiste à déterminer l'ensemble des valeurs des paramètres du système. Pour cela, nous considérons un jeu de données limité (quatre points de cinétique) correspondant aux données biologiques du modèle *benchmark*. Ces données sont associées aux variables $c(t)$ et $g(t)$. Les données associées aux autres variables du système d'équations sont considérées comme inconnues. Ainsi, nous nous plaçons dans un cas d'étude où la quantité de données biologiques est limitée.

Nous avons utilisé plusieurs stratégies où nous utilisons un algorithme génétique multi-objectifs où l'écart avec les données biologiques est calculé avec et sans les connaissances qualitatives pour comparer la pertinence de l'ajout de ces données qualitatives. Nous faisons également varier les bornes des paramètres afin d'en évaluer l'impact.

i. Bornes des paramètres

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les bornes de l'espace de recherche impactent la qualité des solutions proposées par l'algorithme d'optimisation. Les valeurs des paramètres du modèle étant connues, nous considérons dans un premier temps un espace de recherche important appliqué pour chaque paramètre. Pour cela, nous définissons un facteur 100 (exemple pour le paramètre $v = 0,3$ on applique les bornes (0,003 ; 30)) à chaque valeur estimée des paramètres du modèle (Tableau 5). Par la suite, des bornes plus fines sont appliquées en définissant des facteurs 10, 5 puis 2. La validation des paramètres estimés repose sur la capacité du modèle à reproduire les dynamiques du modèle *benchmark* à partir des valeurs des paramètres initialement estimées.

Hypothèse : les bornes de l'espace de recherche impactent la qualité des solutions proposées par l'algorithme d'optimisation.

Validation : la validation des paramètres estimés repose sur la capacité du modèle à reproduire les dynamiques du modèle *benchmark* à partir des valeurs des paramètres initialement estimées.

Paramètres	Valeurs estimées (de Oliveira <i>et al.</i> , 2021) (modèle 2)
χ_m	2.0201
χ_n	3.9392
v	0.3
ϕ	10^{-3}
α	4150.0
γ_a	9.0
γ_m	0.315
γ_c	3.0
γ_g	11.9925
k_g	15.008
k_a	2379.108
k_n	60.4759
β_a	172.1065
β_n	172.1065
β_c	2.8549
β_g	0.6821
β_{gc}	38.9759
k_m	2.7198
β_m	159.77
ω	0.2

Tableau 5. Valeurs estimées des paramètres du modèle benchmark.

ii. Ajout de connaissances qualitatives à la fonction de coût

Dans ce travail, nous avons proposé la fonction de coût qui suit :

$$err = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{\hat{y}_i - y_i}{\hat{y}_{max}} \right|^2 \quad (26)$$

Dans ce contexte d'étude, nous avons deux objectifs qui sont de minimiser séparément les deux variables pour lesquelles nous disposons de données biologiques ($c(t)$ et $g(t)$). Le principe des algorithmes mono-objectif repose sur l'agrégation de toutes les erreurs que nous calculons (écart entre les données biologiques et simulées). Nous avons donc utilisé un algorithme d'optimisation qui est dit « multi-objectifs » : NSGA-II proposé par Deb Kalyanmoy et ses collaborateurs en 2000 (Deb *et al.*, 2000). Nous avons effectué 12 réplicats avec 150 générations pour une population de 400 individus. La méthode de sélection NSGA-II (« *Non dominated Sorting Genetic Algorithm* ») est un des algorithmes génétiques d'optimisation les plus populaires et adapté au multi-objectifs. Elle repose sur la notion d'équilibre et d'optimum de Pareto développé par Vilfredo Pareto au XIX^{ème} siècle. Un optimum de Pareto se définit comme une solution idéale pour laquelle un critère ne peut pas être amélioré sans en détériorer un autre (Debreu, 1954). Le front de Pareto correspond à l'ensemble des solutions optimales. Par définition, il n'existe pas de meilleure solution en dehors de celles se trouvant sur ce front (Figure 47).

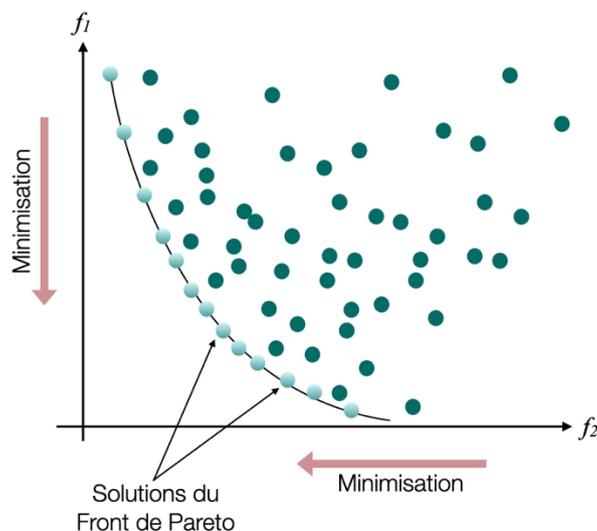


Figure 47. Illustration du Front de Pareto.

Représentation schématique d'un front de Pareto dans le cas d'une minimisation de deux objectifs (f_1 et f_2). Ce front de Pareto regroupe les meilleures solutions, nommées « solutions de Pareto », au problème posé.

La stratégie mise en place pour la calibration du modèle utilise des contraintes basées sur les connaissances *a priori* qui sont appliquées sur le calcul des fonctions de coût. En effet, il semblerait, au vu des résultats obtenus sur notre modèle, que la simple application de bornes ne

permet pas d'obtenir des résultats pertinents sur l'estimation des paramètres. Pour cela, en se basant sur leur travail et avec les connaissances dont nous disposons sur la réponse inflammatoire, nous avons établi six contraintes basées sur les connaissances *a priori* des cinétiques déjà obtenues :

Contraintes temporelles :

- *contrainte n°1* : le pic de recrutement des macrophages est atteint entre le 11^{ème} et le 12^{ème} jour,
- *contrainte n°2* : le pic de recrutement des neutrophiles s'effectue avant le pic de recrutement des macrophages. Cet écart d'afflux des populations cellulaires doit être égal ou supérieur à 4 heures,
- *contrainte n°3* : le pic de recrutement des neutrophiles est transitoire et s'effectue entre le 3^{ème} et 8,5^{ème} jour post lésion.

Contraintes d'amplitude :

- *contrainte n°4* : nous avons fixé une amplitude maximale pour la dynamique des macrophages. Le nombre maximal de macrophages recruté doit être compris entre 0.9×10^4 et 2.0×10^4 cellules/mm⁻³,
- *contrainte n°5* : le nombre maximal de neutrophiles activés doit être compris entre 20% et 80% du nombre total de macrophages,
- *contrainte n°6* : la réaction inflammatoire ne perdure pas dans le temps, et la valeur moyenne de toutes les courbes doit donc être comprise entre 0 et 10 après le 35^{ème} jour.

Afin d'intégrer ces contraintes à la fonction de coût, nous calculons la distance à la borne la plus proche et mettons cette distance au carré. Dans le cas où la contrainte est satisfaite la valeur associée dans la fonction de coût est 0.

Il est important de préciser que ces contraintes doivent être relativement souples pour définir un cadre biologiquement plausible ce qui permet par la suite de ne considérer que les résultats ayant satisfait pleinement chacune des contraintes. Ainsi, nous pourrons nous focaliser sur les objectifs restants, en s'appuyant sur la mesure de l'erreur des données expérimentales.

c. Résultats

Nous avons comparé la méthode NSGA-II (multi-objectifs) avec le standard des algorithmes génétiques (GA) en mono-objectif (Figure 48). Comme on s’y attendait, ce dernier présente des solutions moins optimales par rapport à NSGA-II (Deb *et al.*, 2002). Bien que l’analyse du front du Pareto montre de meilleurs résultats d’optimisation dans la condition NSGA-II sans contraintes, les combinaisons des paramètres obtenues ne permettent pas de produire des cinétiques qui sont cohérentes avec les observations biologiques (Figure 48). On se trouve ici dans un cas de surapprentissage. Sans l’application des contraintes dans l’évaluation de la fonction coût, la méthode d’optimisation, basée sur le calcul de l’erreur entre les données simulées et biologiques, ne permet pas de trouver une combinaison optimale de paramètres. Ce constat est valable quel que soit l’espace de recherche défini sur les paramètres, pour lesquels on constate notamment un comportement instable du modèle même lorsque les intervalles appliqués sont proches des valeurs initialement estimées. En appliquant les différentes contraintes que nous avons définies au préalable, l’exploration des paramètres donne des résultats plus satisfaisants, quelles que soient les bornes appliquées pour chaque paramètre (Figure 49). A noter que les paramètres déterminés par cette approche sont distincts de ceux retrouvés dans le modèle *benchmark*.

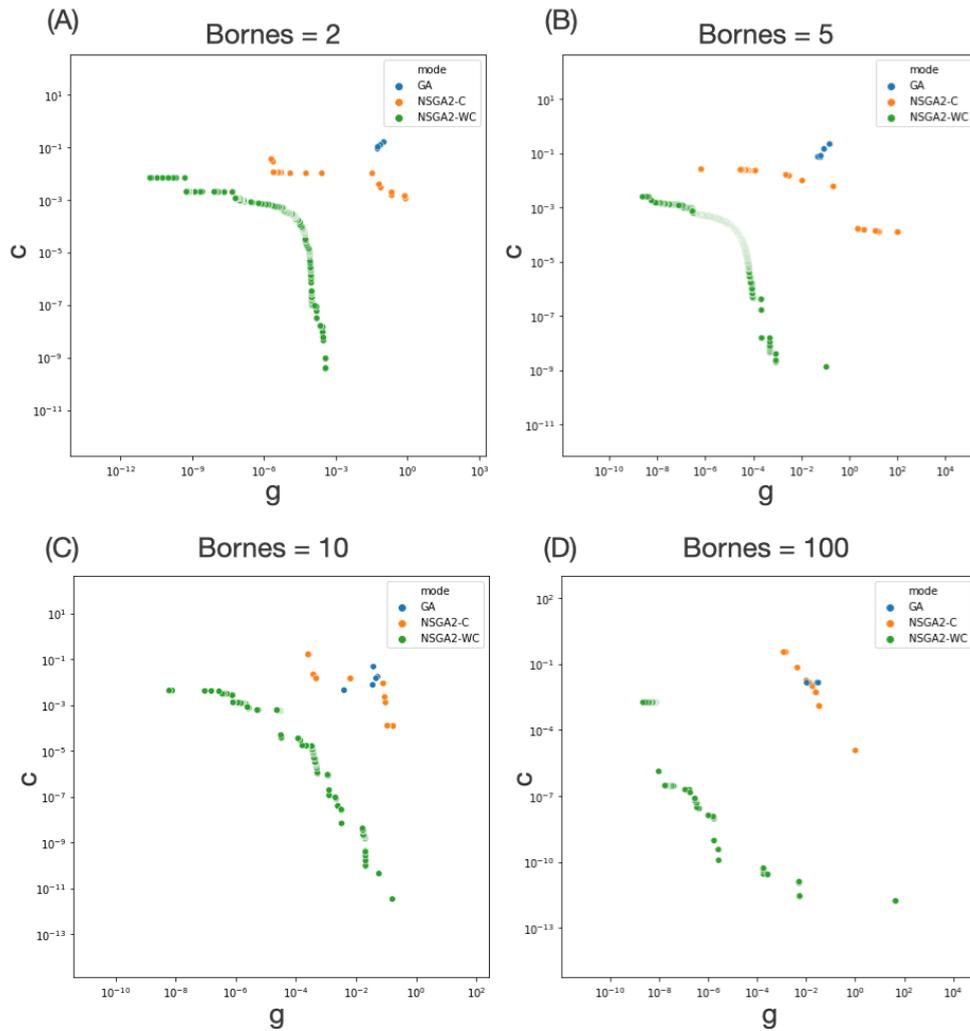


Figure 48. *Front de Pareto sur l'optimisation du modèle de benchmark.*

Visualisation des solutions de Pareto pour la minimisation de deux objectifs : c (médiateurs pro-inflammatoires) et g (anti-inflammatoires). Plusieurs conditions ont été testées utilisant : l'algorithme génétique (GA), l'algorithme NSGA-II avec les contraintes « qualitatives » définies (NSGA2-C) et l'algorithme NSGA-II sans les contraintes (NSGA2-WC). Le panel (A) représente l'optimisation lancée pour un espace de recherche où un facteur 2 a été appliqué sur les valeurs des paramètres estimés du travail d'Oliveira et ses collaborateurs. Dans le panel (B), (C) et (D) des facteurs de 5, 10 et 100 ont été respectivement appliqués.

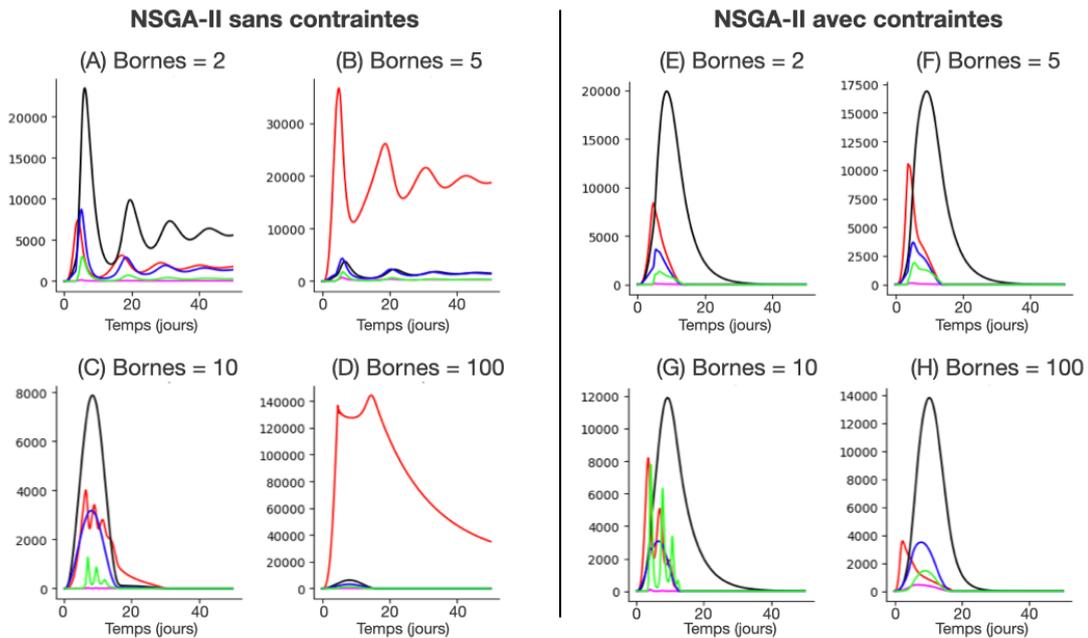


Figure 49. Optimisation du modèle de benchmark avec l'algorithme NSGA-II.

L'optimisation a été lancée avec l'algorithme NSGA-II avec les contraintes « qualitatives » (panels (A) à (D)) et sans les contraintes (panels (E) à (H)). Quatre conditions ont été réalisées sur les bornes pour la recherche des paramètres. Des facteurs de 2, 5, 10 et 100 ont été appliqués sur les valeurs des paramètres estimés du travail d'Oliveira et ses collaborateurs. Les variables (n), (a), (m), (c) et (g) correspondent respectivement aux couleurs rouge, rose, noir, bleu et vert. Pour chaque condition, la meilleure solution de Pareto est affichée.

3. Conclusions

A partir d'une quantité de données limitée, cette stratégie montre que la méthodologie développée, associée à la métrique d'évaluation que nous proposons, semble pertinente pour l'estimation des paramètres. L'utilisation de données qualitatives sur la mesure de la fonction de coût est rarement utilisée pour l'estimation des paramètres de modèles *in silico*, notamment en biologie. Dans le travail proposé par Mitra et ses collaborateurs, les auteurs montrent également l'intérêt d'associer des données qualitatives et quantitatives pour paramétrer les modèles biologiques. Ils convertissent les données qualitatives en contraintes évaluées dans la fonction de coût (Mitra *et al.*, 2018; Mitra and Hlavacek, 2019). A ma connaissance, cette méthodologie semble peu développée dans la littérature scientifique. Cependant, au vu des résultats obtenus sur le modèle *benchmark*, il serait pertinent d'explorer davantage cette méthode notamment sur la façon dont elle pourrait aider à la construction d'un modèle lorsque les données sont limitées. En perspective de ce travail, nous allons appliquer cette stratégie sur un second modèle de la littérature plus complexe afin d'en évaluer la robustesse.

Chapitre 3. Analyse du modèle.

I. Calibration du modèle de la réponse inflammatoire

1. Méthodologie de calibration

Les résultats obtenus sur le modèle *benchmark* nous ont amenés à retenir la stratégie de calibration basée sur l'application de connaissances *a priori* sur le calcul de la fonction de coût. Nous nous plaçons dans la même condition que pour le modèle *benchmark* en utilisant la stratégie NSGA-II. Nous avons utilisé la même fonction de coût permettant de minimiser l'écart entre les données simulées et les données biologiques :

$$err = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{\hat{y}_i - y_i}{\hat{y}_{max}} \right|^2 \quad (27)$$

où \hat{y}_i correspond aux données d'expertise, y_i aux données simulées et n au nombre de mesures. La mesure de l'erreur sur M1 et M2 tient compte des écart-types des données biologiques (une mesure de l'erreur est effectuée sur la moyenne de tous les points).

De façon similaire au modèle de *benchmark*, nous avons défini plusieurs contraintes qui nous semblent cohérentes avec les connaissances *a priori* :

- *Contrainte n°1* : nous avons agrégé toutes les contraintes associées au pic de recrutement des différentes populations cellulaires :
 - le pic de recrutement des MC1 doit être supérieur à 18 heures et inférieur à 36 heures post-lésion,
 - le pic de recrutement des MR1 doit être inférieur à 23 heures post-lésion,
- *Contrainte n°2* : la valeur maximale de MC1 doit être supérieure à celle de MR1 (120%),
- *Contrainte n°3* : la valeur maximale de MR1 doit être supérieure ou égale à 10% de la valeur maximale de MC1,
- *Contrainte n°4* : la valeur du paramètre d'efférocytose des MR1 doit être supérieure à celle des MC1.

Nous calculons les erreurs associées à chacune de ces contraintes et associées aux données biologiques M2 et M1. La comparaison avec les données M1 se fait en additionnant les MR1

et MC1. Nous avons également défini les mêmes bornes que pour la stratégie utilisant CMA-ES et les données d'expertises (voir tableau 4).

2. Résultats d'estimation des paramètres

Les résultats de simulations obtenus sur le front de Pareto partagent un comportement similaire du modèle. Afin d'illustrer ces résultats, nous avons retenu une des solutions du front de Pareto, respectant les contraintes que nous avons fixées (erreur strictement inférieure à 10^{-3}) (Figure 50).

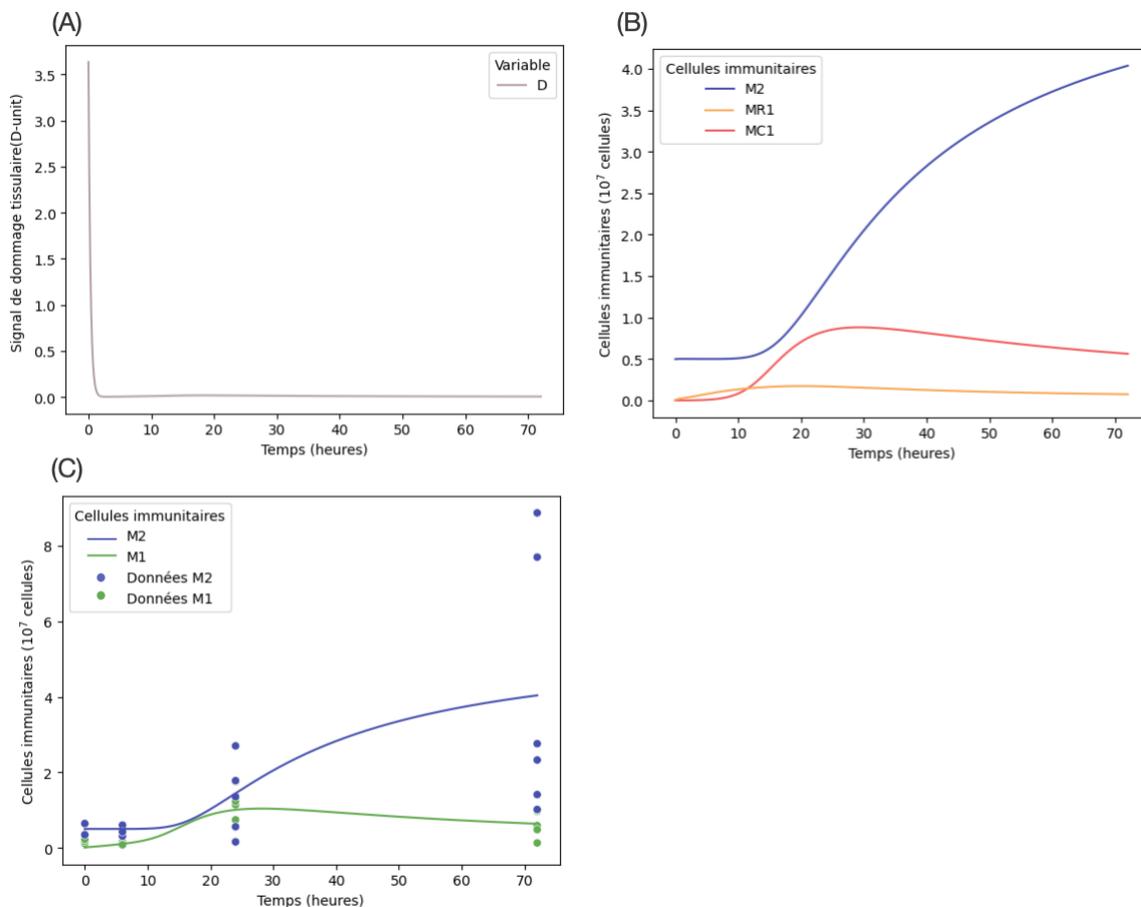


Figure 50. Optimisation de notre modèle avec l'algorithme multi-objectifs NSGA-II sur les données biologiques.

Le panel (A) correspond à la prédiction du modèle pour la variable D , associée au dommage tissulaire et exprimée en D -unit. Le panel (B) correspond à la prédiction du modèle pour les variables $M2$ (macrophages résolutifs), $MR1$ (macrophages résidents inflammatoires) et $MC1$ (macrophages inflammatoires dérivés des monocytes). Le panel (C) reprend la dynamique de la variable $M2$ obtenue dans le panel (B). La dynamique des macrophages inflammatoire totaux obtenue par le modèle est représenté avec la variable $M1$ ($M1$ correspond à la somme des $MR1$ et $MC1$). Les points correspondent aux données biologiques du laboratoire.

On constate que l'estimation des valeurs des paramètres génère des cinétiques différentes comparées au résultat de la calibration obtenue avec l'algorithme CMA-ES pour laquelle nous avons utilisé les données biologiques. Bien que nous ayons obtenu un jeu optimal de paramètres respectant chacune de nos contraintes (Figure 50 (A) et (B) ; Tableau 6), la variable D a cependant un profil particulier caractérisé par une diminution brutale jusqu'à atteindre une valeur nulle en moins de 2 heures (Figure 50 (C)). Étant donné que cette variable n'est pas associée à un marqueur biologiquement mesurable, nous n'avons pas appliqué de contrainte lors de l'optimisation. Cependant, son allure particulière interroge car en effet, nous avons défini cette variable comme étant un signal d'endommagement pouvant notamment inclure des signaux pro-inflammatoires, des débris cellulaires ou encore des cellules apoptotiques. Hormis ce résultat, les dynamiques obtenues pour les autres variables semblent cohérentes avec les connaissances dont nous disposons, notamment avec un recrutement plus tardif des MC1 que des MR1.

Paramètres	Valeurs estimées	Définition	Unités
i_1	0.224	Signal i produit par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
i_2	0.275	Signal i produit par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
kd_1	0.232	Taux de décroissance de MR1	h^{-1}
kd_2	0.178	Taux de décroissance de MC1	h^{-1}
kd_3	0.001	Taux de décroissance de M2	h^{-1}
s_1	0.0001	Coefficient de <i>switch</i> de MR1 en M2	$Munit$
s_2	9.108	Phagocytose par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
s_3	1.117	Coefficient de <i>switch</i> de MC1 en M2	$Munit$
s_4	6.874	Phagocytose par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
s_5	6.022	Phagocytose par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_1	0.234	Taux d'activation de MR1 par I	h^{-1}
x_2	9.781	Taux d'auto-activation de MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_3	1.342	Taux d'activation de MR1 par MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_4	0.850	Taux d'inhibition de MR1 par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_5	0.166	Coefficient de Michaelis-Menten	h^{-1}
x_6	5.910	Coefficient de Michaelis-Menten	h^{-1}
x_7	0.024	Taux d'activation de MC1 par I	h^{-1}
x_8	0.073	Taux d'activation de MC1 par MR1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_9	5.548	Taux d'auto-activation de MC1	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
x_{10}	4.024	Taux d'inhibition de MC1 par M2	$h^{-1} \times Munit^{-1}$
r_1	0.056	Taux d'activation de MR1	$Munit \times h^{-1}$
r_2	0.977	Taux d'activation de MC1	$Munit \times h^{-1}$

h : heure.

Tableau 6. Valeurs des paramètres estimées de notre modèle avec l'algorithme NSGA-II.

3. Conclusions

L'ajout progressif de contraintes basées sur les connaissances *a priori*, nous a permis de trouver un jeu de paramètres cohérent avec les données biologiques, à l'exception de la variable D pour laquelle aucune contrainte n'avait été fixée. Ces résultats posent plusieurs questions. Les contraintes appliquées sont peut-être trop souples avec un espace de recherche complexe. En effet, nous avons vu qu'avec le modèle benchmark, le fait d'appliquer plusieurs contraintes permet de guider d'avantage l'algorithme vers une solution optimale satisfaisante. On pourrait alors appliquer de nouvelles contraintes, notamment sur la variable D qui ne devrait pas décroître avant que les macrophages soient présents au niveau du foyer inflammatoire. L'incohérence associée à la variable D pourrait être due également à une mauvaise retranscription du mécanisme biologique par les équations différentielles.

II. Analyse du modèle

1. Analyse de sensibilité du modèle

Nous avons analysé le comportement du modèle mathématique à partir des valeurs des paramètres déterminés dans la partie précédente. Les paramètres estimés sont incertains, en partie à cause du manque de données biologiques auquel nous sommes confrontés et à l'espace de recherche important appliqué pour chaque paramètre. Par conséquent, un moyen d'évaluer ces paramètres est de déterminer leur sensibilité. Cette analyse peut conduire à une meilleure estimation des valeurs des paramètres et donc réduire l'incertitude sur les résultats de calibration. De surcroît, cette analyse permet d'évaluer la robustesse du modèle mathématique et pourrait aider à sa simplification en identifiant les paramètres ayant peu d'impact sur le comportement du modèle (Iooss and Lemaître, 2015).

Cette analyse consiste à évaluer l'impact de la modification d'un paramètre sur le comportement du modèle mathématique. Pour cela, il existe deux catégories d'analyse de sensibilité des paramètres (Borgonovo and Plischke, 2016).

La première stratégie, la plus utilisée, repose sur une analyse de sensibilité locale. Elle consiste à modifier individuellement un paramètre du modèle et à étudier son influence sur le comportement du modèle. Les autres paramètres restent alors fixés à leur valeur initiale. Ainsi, avec cette méthode il est intéressant de pouvoir évaluer comment la modification de la valeur d'un paramètre peut conduire à une modification de la prédiction du modèle. Parmi les

méthodes utilisant cette stratégie on trouve la méthode couramment nommée OAT (« *One-At-a-Time* »).

La seconde stratégie consiste à analyser la sensibilité d'un paramètre en tenant compte des interactions entre l'ensemble des paramètres du modèle. A contrario de l'analyse de sensibilité locale, cette analyse permet d'évaluer les interactions entre les paramètres du modèle. L'analyse de sensibilité basée sur l'analyse de variance (indice de Sobol), ou encore la méthode d'échantillonnage par hypercube latin (LHS : « *Latin Hypercube Sampling* »), sont des méthodes largement retrouvées pour l'analyse de sensibilité globale (Iooss and Lemaître, 2015).

Pour l'analyse de sensibilité de notre modèle, nous avons utilisé la stratégie d'analyse de sensibilité locale des paramètres estimés du modèle. Cette stratégie permet de cibler des paramètres sensibles de notre modèle et pourrait nous aider à identifier des incohérences. En effet, nous savons que certains paramètres, comme l'activité de clairance des macrophages inflammatoires, sont primordiaux à la résolution de l'inflammation. Ainsi, nous pouvons vérifier si ces observations biologiques sont retrouvées dans notre modèle.

Nous avons analysé la sensibilité de paramètres clés de notre modèle. Pour cela, nous avons utilisé les valeurs des paramètres obtenues avec la stratégie de calibration basée sur l'algorithme CMA-ES. Nous avons étudié l'impact du paramètre de recrutement des MC1 (r_2) en faisant varier sa valeur à $\pm 90\%$ de sa valeur initiale. On observe que l'augmentation de la valeur r_2 diminue le signal d'endommagement (D) (Figure 51 (A)). A l'inverse, lorsque la valeur r_2 diminue, le signal D tend à perdurer, voir à augmenter jusqu'à la fin de la simulation ce qui pourrait indiquer l'apparition d'une inflammation chronique. Cette observation semble pertinente avec ce qui est retrouvé dans la littérature. En effet, les macrophages sont nécessaires pour résoudre l'inflammation et participer à la clairance du foyer inflammatoire.

En revanche, une augmentation de la valeur du paramètre de recrutement associé aux MR1 (r_1) induit un maintien du signal d'endommagement (Figure 51 (B)). Cette observation semble indiquer que lorsque le recrutement des macrophages résidents inflammatoires est important, ils participent alors au maintien du signal inflammatoire. Ce résultat suggère que l'apoptose des macrophages résidents est nécessaire à une résolution efficace de l'inflammation, ce qui est cohérent avec une hypothèse formulée dans la littérature selon laquelle l'apoptose des macrophages résidents participe au recrutement des cellules immunitaires (Yatim *et al.*, 2015; Ginhoux *et al.*, 2017).

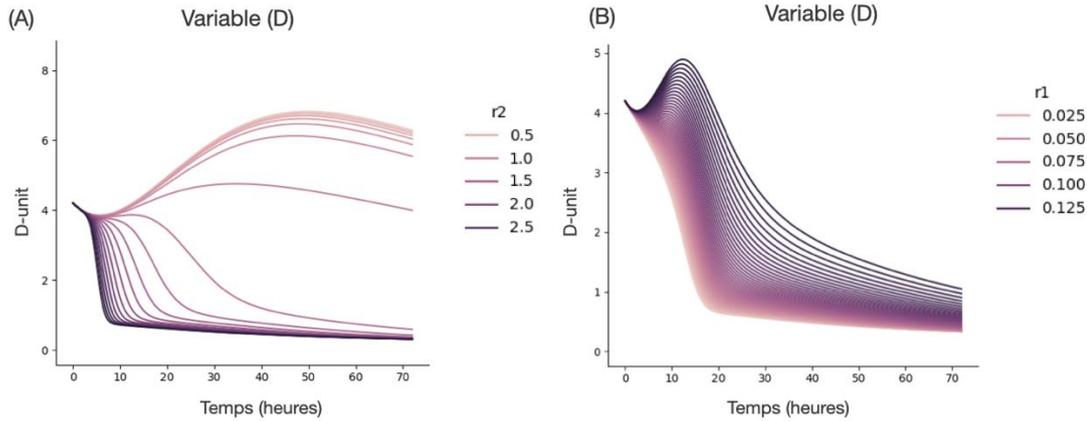


Figure 51. Dynamique de la variable D après variation des paramètres r_2 et r_1 .

L'analyse de sensibilité locale a été effectuée sur les paramètres r_2 (panel (A)) et r_1 (panel (B)). Une variation de $\pm 90\%$ de la valeur initiale (Tableau 4) de ces paramètres a été effectuée. L'impact de ces modifications est visualisé sur la variable D associé au dommage tissulaire.

Nous avons également testé la sensibilité des paramètres associés à l'efférocytose, s_2 et s_4 (associés aux MR1 et MC1 respectivement). La variation du paramètre s_2 n'a pas d'effet sur notre modèle, à l'inverse de celle du paramètre s_4 pour lequel une faible variation de sa valeur induit des perturbations du modèle. Si la modification du comportement du modèle à la suite de la variation d'un paramètre signe l'importance de ce paramètre dans le modèle, l'absence d'effet ne signifie pas forcément l'absence d'influence (Saltelli and Annoni, 2010).

2. Conclusions

Les résultats de cette analyse de sensibilité locale montrent que les paramètres clés que nous avons ciblés comme étant importants dans ce processus de résolution de l'inflammation ont un impact significatif sur le modèle. De plus, ces résultats semblent être cohérents avec ce qui est retrouvé dans la littérature. Bien que cette stratégie d'analyse de sensibilité de paramètres soit populaire, une de ses limites est qu'elle est semi-quantitative. Elle permet seulement de donner un indice sur l'importance des paramètres du modèle. Une autre limite de cette analyse locale est qu'elle explore qu'un ensemble limité de l'espace de recherche des paramètres (Qian and Mahdi, 2020). Nous avons également essayé d'effectuer un échantillonnage par hypercube du modèle afin d'aider à la convergence d'un ensemble de paramètres cohérent avec les données biologiques. Cependant, à cause de l'incertitude que nous avons sur ces valeurs, l'intervalle de recherche appliqué pour chaque paramètre n'a pas permis d'aboutir à des résultats satisfaisants.

Partie III. Discussion et perspectives

Ce travail de thèse a porté sur le développement d'un modèle *in silico* de la réponse inflammatoire induite par une lésion tissulaire. Le premier objectif était de pouvoir modéliser la dynamique des macrophages recrutés au cours de ce processus, en tenant compte de leurs origines distinctes, et d'explorer leur rôle respectif. Cet objectif a été atteint, puisque nous proposons dans ce travail un modèle basé sur 4 équations différentielles couplées qui, à notre connaissance, est le premier à explorer le rôle respectif des macrophages de différentes origines au cours d'un processus physiologique.

Les résultats préliminaires de notre modèle sont cohérents avec les connaissances biologiques. Le modèle ainsi construit semble recouvrir les principaux mécanismes biologiques de la réponse inflammatoire. Comme nous l'avons souligné dans l'état de l'art de ce manuscrit, l'étude des différentes populations de macrophages est un enjeu d'actualité (Blériot et al., 2020), notamment dans un contexte de vieillissement où nous supposons qu'ils sont impliqués dans l'altération de la qualité de réparation tissulaire et participent à l'*inflammaging*. Ainsi, ce modèle mathématique peut être un outil pertinent pour explorer l'implication des macrophages de différentes origines dans la réparation tissulaire dans différents contextes (physiologique, pathologique). C'est une approche de choix pour tester une multitude d'hypothèses facilement et à moindre coût en comparaison avec les expérimentations *in vivo*.

En perspective de ce projet de thèse, il pourrait être intéressant de poursuivre l'étude de ce modèle en exploitant de nouvelles données sur le vieillissement ou d'autres contextes de lésion tissulaire. Nous pourrions également envisager de faire évoluer le modèle en incluant de nouvelles populations cellulaires (neutrophiles par exemple) et de nouveaux paramètres (production de médiateurs pro et/ou anti-inflammatoires). Ce modèle pourrait être étendu aux phases qui suivent la phase inflammatoire en incluant des cellules stromales ou des cellules souches par exemple.

Une des limites de ce modèle est qu'il ne tient pas compte de la spatialisation des populations cellulaires. *In vivo*, on sait que les cellules ne se distribuent pas de façon homogène entre le site de la lésion et le reste du tissu. Nous pourrions donc envisager de faire évoluer ce modèle en y ajoutant la composante spatiale en utilisant des équations aux dérivées partielles (Pigozzo *et al.*, 2013). Une autre projection pour ce modèle est de pouvoir l'associer à un modèle basé sur les agents. En effet, l'intégration d'équations différentielles ordinaires dans un modèle basé sur les agents permet de modéliser des systèmes dynamiques de manière précise et continue, en tenant compte des interactions entre les agents et leur environnement. Ainsi, l'ajout d'équations différentielles ordinaires dans un modèle basé sur les agents permet de simuler des

comportements plus complexes et réalistes, et pourrait faire émerger de nouveaux concepts (Ruiz-Martinez *et al.*, 2022; Krinner *et al.*, 2013; Rikard *et al.*, 2019).

Ce travail soulève plusieurs points qui pourraient être développés dans de futurs travaux. Il serait notamment intéressant de pouvoir tester le modèle en utilisant un autre jeu de données. En effet, la qualité du jeu de données utilisé dans ce travail de thèse est à prendre en compte, notamment les écart-types ainsi que les points de cinétiques qui sont peu nombreux. A ce jour, l'estimation de ces valeurs de paramètres reste qualitative et les premiers résultats obtenus doivent être validés en évaluant l'incertitude des valeurs des paramètres estimés. Déterminer les paramètres sensibles du modèle à l'aide d'une évaluation de la sensibilité globale, comme l'analyse de Sobol (Zhang *et al.*, 2015) ou des méthodes d'apprentissage machine par exemple (Torres, 2021), pourrait permettre d'étudier le comportement du modèle et les interactions entre chaque paramètre. Cette analyse, couplée à une validation avec de nouvelles données, pourrait conforter le choix des variables que nous avons effectué. Une fois le modèle validé par confrontation avec de nouveaux jeux de données, il pourrait être intéressant d'ajouter des phénomènes aléatoires au modèle en utilisant l'algorithme Gillespie (Gillespie, 2000) qui permettrait d'intégrer de la variabilité.

Stratégies de calibration

Deux stratégies, basées sur l'estimation des paramètres inconnus de notre modèle, ont été mises en place durant ce travail de thèse. Ces deux stratégies permettent d'aider à la calibration des modèles mathématiques à partir de données limitées et sans connaissances sur les intervalles de confiance pour les paramètres.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'utilisation de données, dites d'expertise, permet de pallier au manque de données biologiques et de guider l'algorithme d'optimisation (CMA-ES) vers une solution optimale, cohérente avec nos attentes. Ces données d'expertise sont générées à partir de connaissances *a priori* sur les points de cinétique pour lesquels on a peu ou pas de données. Cette méthodologie nous a permis de vérifier que le modèle mathématique est capable de décrire le processus biologique que nous souhaitons modéliser. En effet, l'utilisation de modèles intermédiaires plus complexes (nombre de variables et de paramètres inconnus plus important) n'a pas pu aboutir à une estimation satisfaisante des paramètres. Nous avons également exploré la stratégie de calibration sur équation isolée en utilisant la régression des données à la place des valeurs produites par chaque équation différentielle. Cette méthodologie semble intéressante pour guider la construction d'un modèle mathématique. Elle suppose cependant de connaître les dynamiques de chacune des variables

composant le modèle. Bien que ces données d'expertise soient basées sur des connaissances, cette stratégie est limitante. En effet, la validation d'un modèle repose sur sa capacité à reproduire des données biologiques.

La seconde stratégie mise en place répond également à une problématique d'optimisation des paramètres en présence d'une quantité limitée de données. Elle repose sur l'utilisation d'un algorithme génétique multi-objectifs, évaluant l'écart entre les données biologiques et simulées et tient compte des erreurs associées à des contraintes qualitatives imposées. Ces contraintes permettent d'orienter l'algorithme vers une solution biologiquement plausible. Cette méthode permet de s'abstraire des données d'expertise, en appliquant des contraintes souples basées sur des connaissances *a priori*. Les modèles mathématiques peuvent être confrontés à des problèmes d'optimisation comme cela a été le cas dans ce travail où nous considérons qu'aucun paramètre du modèle n'est déterminé. Les premiers résultats, apportés à la fois par le modèle *benchmark* et notre modèle, montrent que cette stratégie est pertinente pour guider l'algorithme à la recherche d'une combinaison optimale de paramètres. Il pourrait être pertinent de valider cette méthodologie sur un autre modèle de *benchmark* pour lequel des connaissances *a priori* peuvent être définies sous forme de contraintes. Cela permettrait de valider cette stratégie de calibration.

Ainsi, au cours de ce travail de thèse deux stratégies mises en place ont permis de guider la construction du modèle mathématique à partir d'un jeu de données limité.

Références bibliographiques

- Aarts,E. *et al.* (2005) Simulated annealing. In, Search methodologies. Springer, Boston, MA, pp. 187–2010.
- Abi Younes,G. and El Khatib,N. (2022) Mathematical modeling of inflammatory processes of atherosclerosis. *Math. Model. Nat. Phenom.*, **17**, 5.
- Acerbi,E. *et al.* (2016) Continuous time Bayesian networks identify Prdm1 as a negative regulator of TH17 cell differentiation in humans. *Sci Rep*, **6**, 23128.
- Adusei,K.M. *et al.* (2021) T lymphocytes as critical mediators in tissue regeneration, fibrosis, and the foreign body response. *Acta Biomaterialia*, **133**, 17–33.
- Aegerter,H. *et al.* (2020) Influenza-induced monocyte-derived alveolar macrophages confer prolonged antibacterial protection. *Nat Immunol*, **21**, 145–157.
- Agrahari,R. *et al.* (2018) Applications of Bayesian network models in predicting types of hematological malignancies. *Sci Rep*, **8**, 6951.
- Albergante,L. *et al.* (2013) A Petri Net Model of Granulomatous Inflammation: Implications for IL-10 Mediated Control of Leishmania donovani Infection. *PLoS Comput Biol*, **9**, e1003334.
- Albert,R. and Othmer,H.G. (2003) The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Theoretical Biology*, **223**, 1–18.
- Ali,R.A. *et al.* (2015) Platelets: essential components of the immune system. *Current trends in immunology*.
- van Amerongen,M.J. *et al.* (2007) Macrophage Depletion Impairs Wound Healing and Increases Left Ventricular Remodeling after Myocardial Injury in Mice. *The American Journal of Pathology*, **170**, 818–829.
- An,G. *et al.* (2009) Agent-based models in translational systems biology. *WIREs Mechanisms of Disease*, **1**, 159–171.
- Annales de l’Institut Pasteur : p. 199 (1887).
- Antonelli,M. and Kushner,I. (2017) It’s time to redefine inflammation. *FASEB j.*, **31**, 1787–1791.
- Arango Duque,G. and Descoteaux,A. (2014) Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.*, **5**.
- Aratani,Y. (2018) Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **640**, 47–52.

- Ashyraliyev, M. *et al.* (2009) Systems biology: parameter estimation for biochemical models: Parameter estimation in systems biology. *FEBS Journal*, **276**, 886–902.
- Auchincloss, A.H. and Diez Roux, A.V. (2008) A New Tool for Epidemiology: The Usefulness of Dynamic-Agent Models in Understanding Place Effects on Health. *American Journal of Epidemiology*, **168**, 1–8.
- Austermann, J. *et al.* (2022) The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells*, **11**, 1979.
- Aw, D. *et al.* (2007) Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*, **120**, 435–446.
- Bain, C.C. *et al.* (2013) Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol*, **6**, 498–510.
- Baldan, P. *et al.* (2010) Petri nets for modelling metabolic pathways: a survey. *Nat Comput*, **9**, 955–989.
- Bandyopadhyay, S. *et al.* (2015) Data mining for censored time-to-event data: a Bayesian network model for predicting cardiovascular risk from electronic health record data. *Data Min Knowl Disc*, **29**, 1033–1069.
- Banga, J.R. (2008) Optimization in computational systems biology. *BMC Syst Biol*, **2**, 47.
- Barros, L. *et al.* (2022) The fellowship of regulatory and tissue-resident memory cells. *Mucosal Immunol*, **15**, 64–73.
- Bartocci, E. and Lió, P. (2016) Computational Modeling, Formal Analysis, and Tools for Systems Biology. *PLoS Comput Biol*, **12**, e1004591.
- Basil, M.C. and Levy, B.D. (2016) Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, **16**, 51–67.
- Basu Mallik, S. *et al.* (2018) Epigenetic modulation of macrophage polarization- perspectives in diabetic wounds. *Journal of Diabetes and its Complications*, **32**, 524–530.
- Becker, J.C. *et al.* (2004) Biological in vitro effects of fibrin glue: fibroblast proliferation, expression and binding of growth factors. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **39**, 927–932.
- Beck-Schimmer, B. *et al.* (2005) Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respir Res*, **6**, 61.
- van Beek, A.A. *et al.* (2019) Metabolic Alterations in Aging Macrophages: Ingredients for Inflammaging? *Trends in Immunology*, **40**, 113–127.
- Bektas, A. *et al.* (2018) Aging, inflammation and the environment. *Experimental Gerontology*, **105**, 10–18.
- Belambri, S.A. *et al.* (2018) NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur J Clin Invest*, **48**, e12951.

- Bely,A.E. and Nyberg,K.G. (2010) Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. 10.
- Bereshchenko,O. *et al.* (2018) Glucocorticoids, Sex Hormones, and Immunity. *Front. Immunol.*, **9**, 1332.
- Berger,C.L. *et al.* (2006) Langerhans cells: Mediators of immunity and tolerance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **38**, 1632–1636.
- Bernard,C. *et al.* (1865) Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. Paris: J. B. Baillière and Fils.
- Bianca,C. and Pennisi,M. (2012) Immune System Modelling by Top-Down and Bottom-Up Approaches. *International Mathematical Forum*, **7**, 20.
- Bianconi,F. *et al.* (2020) Application of conditional robust calibration to ordinary differential equations models in computational systems biology: a comparison of two sampling strategies. *IET syst. biol.*, **14**, 107–119.
- Biernacka,A. and Frangogiannis,N.G. (2011) Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging and Disease*, **2**.
- Bilzer,M. *et al.* (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*, **26**, 1175–1186.
- Black,J. (1988) DRUGS FROM EMASCULATED HORMONES: THE PRINCIPLES OF SYNTOPIC ANTAGONISM. 23.
- Blériot,C. *et al.* (2021) A subset of Kupffer cells regulates metabolism through the expression of CD36. *Immunity*, **54**, 2101-2116.e6.
- Blériot,C. *et al.* (2020) Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity*, **52**, 957–970.
- Blériot,C. *et al.* (2015) Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity*, **42**, 145–158.
- Boehm,T. (2011) Design principles of adaptive immune systems. *Nat Rev Immunol*, **11**, 307–317.
- Bonabeau,E. (2002) Agent-based modeling: Methods and techniques for simulating human systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 7280–7287.
- Bordon,J. *et al.* (2018) Semi-quantitative Modelling of Gene Regulatory Processes with Unknown Parameter Values Using Fuzzy Logic and Petri Nets. *FI*, **160**, 81–100.
- Borgonovo,E. and Plischke,E. (2016) Sensitivity analysis: A review of recent advances. *European Journal of Operational Research*, **248**, 869–887.
- Bornholdt,S. (2008) Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. *J. R. Soc. Interface.*, **5**.
- Boyce,B. *et al.* (2009) Osteoclasts Have Multiple Roles in Bone in Addition to Bone

- Resorption. *Crit Rev Eukar Gene Expr*, **19**, 171–180.
- Bray,D. (2015) Limits of computational biology. *ISB*, **12**, 1–7.
- Brockes,J.P. and Kumar,A. (2008) Comparative Aspects of Animal Regeneration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **24**, 525–549.
- Brodland,G.W. (2015) How computational models can help unlock biological systems. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **47–48**, 62–73.
- Brostjan,C. and Oehler,R. (2020) The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov.*, **6**, 26.
- Broug-Holub,E. *et al.* (1997) Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine Klebsiella pneumonia: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect Immun*, **65**, 1139–1146.
- Broughton,G. *et al.* (2006) A Brief History of Wound Care: *Plastic and Reconstructive Surgery*, **117**, 6S-11S.
- Buckley,C.D. *et al.* (2006) Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *Journal of Leukocyte Biology*, **79**, 303–311.
- Byrne,A.J. *et al.* (2015) Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax*, **70**, 1189–1196.
- Campisi,J. *et al.* (2019) From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*, **571**, 183–192.
- Canton,J. *et al.* (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*, **13**, 621–634.
- Carestia,A. *et al.* (2019) Platelets Promote Macrophage Polarization toward Pro-inflammatory Phenotype and Increase Survival of Septic Mice. *Cell Reports*, **28**, 896-908.e5.
- Caswell,H. (1988) Theory and models in ecology: a different perspective. *Ecological Modelling*, **43**, 33–44.
- Caudill,L. and Lynch,F. (2018) A Mathematical Model of the Inflammatory Response to Pathogen Challenge. *Bull Math Biol*, **80**, 2242–2271.
- Cayrol,C. and Girard,J.-P. (2014) IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Current Opinion in Immunology*, **31**, 31–37.
- Ceresa,M. *et al.* (2018) Coupled Immunological and Biomechanical Model of Emphysema Progression. *Front. Physiol.*, **9**, 388.
- Chacón-Salinas,R. *et al.* (2005) Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected *in vitro* with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology*, **140**, 443–449.
- Chakravarti,D. *et al.* (2021) Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell*, **184**, 306–

- Chalmers,A.D. *et al.* (2015) Bifurcation and dynamics in a mathematical model of early atherosclerosis: How acute inflammation drives lesion development. *J. Math. Biol.*, **71**, 1451–1480.
- Chanda,D. *et al.* (2019) Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. *Molecular Aspects of Medicine*, **65**, 56–69.
- Chapin,J.C. and Hajjar,K.A. (2015) Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*, **29**, 17–24.
- Charo,I.F. and Ransohoff,R.M. (2006) The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N Engl J Med*, **354**, 610–621.
- Chawla,A. *et al.* (2011) Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, **11**, 738–749.
- Chen,G.Y. and Nuñez,G. (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, **10**, 826–837.
- Chen,H.-T. and Rossi,P.H. (1983) Evaluating With Sense: The Theory-Driven Approach. *Eval Rev*, **7**, 283–302.
- Chen,L. *et al.* (2007) Modelling and simulation of signal transductions in an apoptosis pathway by using timed Petri nets. *J Biosci*, **32**, 113–127.
- Chen,Y.G. and Hur,S. (2022) Cellular origins of dsRNA, their recognition and consequences. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **23**, 286–301.
- Chodera,J.D. and Noé,F. (2014) Markov state models of biomolecular conformational dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, **25**, 135–144.
- Chow,A. *et al.* (2011) Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *Journal of Experimental Medicine*, **208**, 261–271.
- Claesson-Welsh,L. *et al.* (2021) Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends in Molecular Medicine*, **27**, 314–331.
- Clark,R.A.F. and Henson,P.M. eds. (1988) *The Molecular and cellular biology of wound repair* Plenum Press, New York.
- Clegg,A. *et al.* (2013) Frailty in elderly people. *The Lancet*, **381**, 752–762.
- Cleri,F. (2019) Agent-based model of multicellular tumor spheroid evolution including cell metabolism. *The European Physical Journal E*, **14**.
- Colonna,M. and Butovsky,O. (2017) Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.*, **35**, 441–468.
- Conrady,S. and Jouffe,D.L. (2013) *Introduction to Bayesian Networks & BayesiaLab*.
- Cooper,M.D. and Alder,M.N. (2006) The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell*, **124**, 815–822.

- Cooper,R.L. *et al.* (2015) Modeling the effects of systemic mediators on the inflammatory phase of wound healing. *Journal of Theoretical Biology*, **367**, 86–99.
- Cox,N. and Geissmann,F. (2020) Macrophage ontogeny in the control of adipose tissue biology. *Current Opinion in Immunology*, **62**, 1–8.
- Cox,S. *et al.* (2004) Behavior of Human Dermal Fibroblasts in Three-Dimensional Fibrin Clots: Dependence on Fibrinogen and Thrombin Concentration. *Tissue Engineering*, **10**, 942–954.
- Crawley,J.T.B. *et al.* (2007) The central role of thrombin in hemostasis: Central role of thrombin in hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **5**, 95–101.
- Cummings,R.J. *et al.* (2016) Different tissue phagocytes sample apoptotic cells to direct distinct homeostasis programs. *Nature*, **539**, 565–569.
- Dai,X.-M. *et al.* (2002) Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*, **99**, 111–120.
- Darby,I.A. and Hewitson,T.D. (2016) Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*, **365**, 553–562.
- Davalos,D. *et al.* (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, **8**, 752–758.
- David,R. and Alla,H. (2001) On Hybrid Petri Nets. *Discrete Event Dynamic Systems*, **11**.
- Davies,L.C. *et al.* (2013) Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*, **14**, 986–995.
- Davis,K.J. (2022) Managed culls mean extinction for a marine mammal population when combined with extreme climate impacts. *Ecological Modelling*, **473**, 110122.
- Day,J. *et al.* (2006) A reduced mathematical model of the acute inflammatory response II. Capturing scenarios of repeated endotoxin administration. *Journal of Theoretical Biology*, **242**, 237–256.
- Day,J.D. *et al.* (2015) Mathematical Modeling of Early Cellular Innate and Adaptive Immune Responses to Ischemia/Reperfusion Injury and Solid Organ Allotransplantation. *Front. Immunol.*, **6**.
- Deb,K. *et al.* (2002) A fast and elitist multiobjective genetic algorithm: NSGA-II. *IEEE Trans. Evol. Computat.*, **6**, 182–197.
- Deb,K. *et al.* (2000) A Fast Elitist Non-dominated Sorting Genetic Algorithm for Multi-objective Optimization: NSGA-II. In, Schoenauer,M. *et al.* (eds), *Parallel Problem Solving from Nature PPSN VI*, Lecture Notes in Computer Science. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 849–858.
- Debreu,G. (1954) Valuation equilibrium and Pareto optimum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **40**.
- Deniset,J.F. *et al.* (2019) Gata6+ Pericardial Cavity Macrophages Relocate to the Injured Heart and Prevent Cardiac Fibrosis. *Immunity*, **51**, 131-140.e5.

- Desel,J. and Reisig,W. (2015) The concepts of Petri nets. *Softw Syst Model*, **14**, 669–683.
- Desmoulière,A. *et al.* (2005) Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*, **13**, 7–12.
- Dick,S.A. *et al.* (2019) Self-renewing resident cardiac macrophages limit adverse remodeling following myocardial infarction. *Nat Immunol*, **20**, 29–39.
- DiMarino,A.M. *et al.* (2013) Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front. Immunol.*, **4**.
- Dinareello,C.A. (2018) Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, **281**, 8–27.
- Ding,X. *et al.* (2021) Regulation of the Wound Healing Response during Aging. *Journal of Investigative Dermatology*, **141**, 1063–1070.
- Dorri,A. *et al.* (2018) Multi-Agent Systems: A Survey. *IEEE Access*, **6**, 28573–28593.
- Doyle,S.E. *et al.* (2004) Toll-like Receptors Induce a Phagocytic Gene Program through p38. *Journal of Experimental Medicine*, **199**, 81–90.
- Drasdo,D. and Höhme,S. (2005) A single-cell-based model of tumor growth *in vitro* : monolayers and spheroids. *Phys. Biol.*, **2**, 133–147.
- Dube,C.T. *et al.* (2022) Age-Related Alterations in Macrophage Distribution and Function Are Associated With Delayed Cutaneous Wound Healing. *Front. Immunol.*, **13**, 943159.
- Duffield,J.S. *et al.* (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.*, **115**, 56–65.
- Dutta-Moscato,J. *et al.* (2014) A Multiscale Agent-Based *in silico* Model of Liver Fibrosis Progression. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2**.
- van Eck,N.J. and Waltman,L. (2010) Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics*, **84**, 523–538.
- Eisenhardt,K.M. (1989) Building Theories from Case Study Research. 20.
- El Kebir,D. and Filep,J.G. (2013) Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through β 2 Integrins. *Front. Immunol.*, **4**.
- El Khatib,N. *et al.* (2012) Reaction–diffusion model of atherosclerosis development. *J. Math. Biol.*, **65**, 349–374.
- Elliott,M.R. *et al.* (2017) Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*, **198**, 1387–1394.
- Elliott,M.R. *et al.* (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, **461**, 282–286.
- Eming,S.A. *et al.* (2007) Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, **127**, 514–525.
- Eming,S.A. *et al.* (2014) Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.*, **6**.

- Emr,B. *et al.* (2014) Removal of Inflammatory Ascites Is Associated With Dynamic Modification of Local and Systemic Inflammation Along With Prevention of Acute Lung Injury: In Vivo and In Silico Studies. *Shock*, **41**, 317–323.
- Epelman,S. *et al.* (2014) Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation. *Immunity*, **40**, 91–104.
- Esfahani,N.S. *et al.* (2021) Aging influences the cardiac macrophage phenotype and function during steady state and during inflammation. *Aging Cell*, **20**.
- Eshghjoo,S. *et al.* (2022) Macrophage Polarization in Atherosclerosis. *Genes*, **13**, 756.
- Falati,S. *et al.* (2002) Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med*, **8**, 1175–1180.
- Ferber,J. and Weiss,G. (1999) Multi-agent systems: an introduction to distributed artificial intelligence. Addison Wesley Reading.
- Ferrucci,L. *et al.* (2020) Measuring biological aging in humans: A quest. *Aging Cell*, **19**.
- Ferrucci,L. and Fabbri,E. (2018) Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*, **15**, 505–522.
- Fisher,J. and Henzinger,T.A. (2007) Executable cell biology. *Nat Biotechnol*, **25**, 1239–1249.
- Flick,M.J. *et al.* (2004) Fibrin(ogen)- α M β 2 Interactions Regulate Leukocyte Function and Innate Immunity In Vivo. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229**, 1105–1110.
- Fontainhas,A.M. *et al.* (2011) Microglial Morphology and Dynamic Behavior Is Regulated by Ionotropic Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission. *PLoS ONE*, **6**, e15973.
- Formanowicz,D., Rybarczyk,A., Radom,M., and Formanowicz,P. (2020) A Role of Inflammation and Immunity in Essential Hypertension—Modeled and Analyzed Using Petri Nets. *IJMS*, **21**, 3348.
- Formanowicz,D., Rybarczyk,A., Radom,M., Tanaś,K., *et al.* (2020) A Stochastic Petri Net-Based Model of the Involvement of Interleukin 18 in Atherosclerosis. *IJMS*, **21**, 8574.
- Fortin,F.-A. (2012) DEAP: Evolutionary Algorithms Made Easy. *The Journal of Machine Learning Research*, **13**, 2171–2175.
- Fouré,J. *et al.* (2013) Modelling the world economy at the 2050 horizon. *Econ Transit*, n/a-n/a.
- Fox,E.S. *et al.* (1987) Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. *Infect Immun*, **55**, 2962–2966.
- Fox,S. *et al.* (2010) Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *J Innate Immun*, **2**, 216–227.
- Franceschi,C., Garagnani,P., Parini,P., *et al.* (2018) Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*, **14**, 576–590.
- Franceschi,C., Garagnani,P., Morsiani,C., *et al.* (2018) The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front. Med.*, **5**, 61.

- Franceschi,C. and Campisi,J. (2014) Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **69**, S4–S9.
- Frevert,C.W. *et al.* (2018) Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity. *J Histochem Cytochem.*, **66**, 213–227.
- Furth,R.V. *et al.* (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, **46**, 845.
- Furze,R.C. and Rankin,S.M. (2008) Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, **125**, 281–288.
- Gabanyi,I. *et al.* (2016) Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell*, **164**, 378–391.
- Gale,A.J. (2011) Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol*, **39**, 273–280.
- Galiano,R.D. *et al.* (2004) Topical Vascular Endothelial Growth Factor Accelerates Diabetic Wound Healing through Increased Angiogenesis and by Mobilizing and Recruiting Bone Marrow-Derived Cells. *The American Journal of Pathology*, **164**, 1935–1947.
- Gangwar,R.S. *et al.* (2020) Differential contribution of bone marrow-derived infiltrating monocytes and resident macrophages to persistent lung inflammation in chronic air pollution exposure. *Sci Rep*, **10**, 14348.
- Gao,Z. *et al.* (2018) Controllability of Conjunctive Boolean Networks With Application to Gene Regulation. *IEEE Trans. Control Netw. Syst.*, **5**, 770–781.
- Garbi,N. and Lambrecht,B.N. (2017) Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, **469**, 561–572.
- García-Ramallo,E. *et al.* (2002) Resident Cell Chemokine Expression Serves as the Major Mechanism for Leukocyte Recruitment During Local Inflammation. *J Immunol*, **169**, 6467–6473.
- Garg,A. *et al.* (2008) Synchronous versus asynchronous modeling of gene regulatory networks. *Bioinformatics*, **24**, 1917–1925.
- Gautier,E.L. *et al.* (2013) Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood*, **122**, 2714–2722.
- Gautier,E.L. *et al.* (2012) Systemic Analysis of PPAR γ in Mouse Macrophage Populations Reveals Marked Diversity in Expression with Critical Roles in Resolution of Inflammation and Airway Immunity. *J.I.*, **189**, 2614–2624.
- Gazi,U. and Martinez-Pomares,L. (2009) Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, **214**, 554–561.
- Geering,B. and Simon,H.-U. (2011) Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ*, **18**, 1457–1469.

- Gentek,R. *et al.* (2014) Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol Rev*, **262**, 56–73.
- Gilbert,G.N. and Troitzsch,K.G. (2005) Simulation for the social scientist 2nd ed. Open University Press, Maidenhead, England ; New York, NY.
- Gillespie,D.T. (2000) The chemical Langevin equation. *The Journal of Chemical Physics*, **113**, 297–306.
- Gilliver,S.C. (2010) Sex steroids as inflammatory regulators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **120**, 105–115.
- Ginhoux,F. *et al.* (2017) Dying for a Cause: Regulated Necrosis of Tissue-Resident Macrophages upon Infection. *Trends in Immunology*, **38**, 693–695.
- Ginhoux,F. and Guilliams,M. (2016) Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, **44**, 439–449.
- Ginhoux,F. and Jung,S. (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, **14**, 392–404.
- Glinton,K.E. *et al.* (2022) Macrophage-produced VEGFC is induced by efferocytosis to ameliorate cardiac injury and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, **132**, e140685.
- Gola,A. *et al.* (2021) Commensal-driven immune zonation of the liver promotes host defence. *Nature*, **589**, 131–136.
- Gosain,A. and DiPietro,L.A. (2004) Aging and Wound Healing. *World Journal of Surgery*, **28**, 321–326.
- Goss,P.J.E. and Peccoud,J. (1998) Quantitative modeling of stochastic systems in molecular biology by using stochastic Petri nets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6750–6755.
- Gray,J.I. and Farber,D.L. (2022) Tissue-Resident Immune Cells in Humans. *Annu. Rev. Immunol.*, **40**, 195–220.
- Gray,R.D. *et al.* (2018) Delayed neutrophil apoptosis enhances NET formation in cystic fibrosis. *Thorax*, **73**, 134–144.
- Greenlee-Wacker,M.C. (2016) Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*, **273**, 357–370.
- Grieb,M. *et al.* (2015) Predicting Variabilities in Cardiac Gene Expression with a Boolean Network Incorporating Uncertainty. *PLoS ONE*, **10**, e0131832.
- Grieco,L. *et al.* (2013) Integrative Modelling of the Influence of MAPK Network on Cancer Cell Fate Decision. *PLoS Comput Biol*, **9**, e1003286.
- Gros,A. *et al.* (2015) Platelets in Inflammation: Regulation of Leukocyte Activities and Vascular Repair. *Front. Immunol.*, **5**.
- Grosman,P.D. *et al.* (2011) Trade-off between road avoidance and attraction by roadside salt pools in moose: An agent-based model to assess measures for reducing moose-vehicle

- collisions. *Ecological Modelling*, **222**, 1423–1435.
- Gschwandtner,M. *et al.* (2019) More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front. Immunol.*, **10**, 2759.
- Guan,Y. *et al.* (2022) The role of microglia in Alzheimer’s disease and progress of treatment. *Ibrain*, **8**, 37–47.
- Guilliams,M. *et al.* (2020) Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity*, **52**, 434–451.
- Guilliams,M. and Svedberg,F.R. (2021) Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity? *Nat Immunol*, **22**, 118–127.
- Guilmeau,T. *et al.* (2021) Simulated Annealing: a Review and a New Scheme. In, *2021 IEEE Statistical Signal Processing Workshop (SSP)*. IEEE, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 101–105.
- Gunawardena,J. (2014) Models in biology: ‘accurate descriptions of our pathetic thinking’. *BMC Biol*, **12**, 29.
- Gurtner,G.C. *et al.* (2008) Wound repair and regeneration. *Nature*, **453**, 314–321.
- Han,J. *et al.* (2010) Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, **115**, 957–964.
- Hansen,N. *et al.* (2003) Reducing the Time Complexity of the Derandomized Evolution Strategy with Covariance Matrix Adaptation (CMA-ES). *Evolutionary Computation*, **11**, 1–18.
- Hansen,N. and Ostermeier,A. (1996) Adapting arbitrary normal mutation distributions in evolution strategies: the covariance matrix adaptation. In, *Proceedings of IEEE International Conference on Evolutionary Computation*. IEEE, Nagoya, Japan, pp. 312–317.
- Harvey,A. *et al.* (2016) Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Canadian Journal of Cardiology*, **32**, 659–668.
- Hashimoto,D. *et al.* (2013) Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. *Immunity*, **38**, 792–804.
- Heckerman,D. (1995) A Tutorial on Learning With Bayesian Networks. *rapp. tech.*, 58.
- Heiner,M. *et al.* (2012) Snoopy – A Unifying Petri Net Tool. In, Haddad,S. and Pomello,L. (eds), *Application and Theory of Petri Nets*, Lecture Notes in Computer Science. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 398–407.
- Hérault,L. *et al.* (2023) A novel Boolean network inference strategy to model early hematopoiesis aging. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **21**, 21–33.
- Hietbrink,F. *et al.* (2006) Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg*, **1**, 15.

- Hoefel,G. *et al.* (2012) Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, **209**, 1167–1181.
- Hoffmann,J. and Akira,S. (2013) Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, **25**, 1–3.
- Hou,Y. *et al.* (2019) Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, **15**, 565–581.
- Huang,C.Y. and Ferrell,J.E. (1996) Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 10078–10083.
- Hugh Perry,V. (1998) A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of Neuroimmunology*, **90**, 113–121.
- Ibáñez,L. *et al.* (2016) Inflammatory Osteoclasts Prime TNF α -Producing CD4⁺ T Cells and Express CX₃CR1: OSTEOCLAST IMMUNOMODULATORY FUNCTION SWITCHES UPON INFLAMMATION. *J Bone Miner Res*, **31**, 1899–1908.
- Ideker,T. *et al.* (2001) A new approach to decoding life : Systems Biology. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, **2**, 343–372.
- Igel,C. *et al.* (2007) Covariance Matrix Adaptation for Multi-objective Optimization. *Evolutionary Computation*, **15**, 1–28.
- Iooss,B. and Lemaître,P. (2015) A Review on Global Sensitivity Analysis Methods. In, Dellino,G. and Meloni,C. (eds), *Uncertainty Management in Simulation-Optimization of Complex Systems*, Operations Research/Computer Science Interfaces Series. Springer US, Boston, MA, pp. 101–122.
- Italiani,P. and Boraschi,D. (2014) From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.*, **5**.
- Jaitin,D.A. *et al.* (2019) Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. *Cell*, **178**, 686-698.e14.
- Jakubzick,C.V. *et al.* (2017) Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*, **17**, 349–362.
- Janardhan,K.,S. (2006) Neutrophil depletion inhibits early and late monocyte/macrophage increase in lung inflammation. *Front Biosci*, **11**, 1569.
- Janssen,W.J. *et al.* (2011) Fas Determines Differential Fates of Resident and Recruited Macrophages during Resolution of Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med*, **184**, 547–560.
- Jaul,E. and Barron,J. (2017) Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front. Public Health*, **5**, 335.
- Jensen,K. (1981) Coloured petri nets and the invariant-method. *Theoretical Computer Science*, **14**, 317–336.
- Jinnouchi,H. *et al.* (2020) Diversity of macrophage phenotypes and responses in

- atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **77**, 1919–1932.
- Joo, J.I. *et al.* (2018) Determining Relative Dynamic Stability of Cell States Using Boolean Network Model. *Sci Rep*, **8**, 12077.
- Jörneskog, G. *et al.* (1996) Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetologia*, **39**, 1519–1523.
- Jr., J.E.F. and Machleder, E.M. (1998) The Biochemical Basis of an All-or-None Cell Fate Switch in *Xenopus* Oocytes. *Science, New Series*, **280**, 895–898.
- Kale, S.S. and Yende, S. (2011) Effects of Aging on Inflammation and Hemostasis through the Continuum of Critical Illness. *Aging and Disease*, **2**.
- Kanda, N. and Watanabe, S. (2005) Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology. *Journal of Dermatological Science*, **38**, 1–7.
- Karelina, T. *et al.* (2016) A Mathematical Modeling Approach to Understanding the Effect of Anti-Interleukin Therapy on Eosinophils. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.*, **5**, 608–616.
- Karlebach, G. and Shamir, R. (2008) Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 770–780.
- Katoch, S. *et al.* (2021) A review on genetic algorithm: past, present, and future. *Multimed Tools Appl*, **80**, 8091–8126.
- Kauffman, S.A. (1969) Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of Theoretical Biology*, **22**, 437–467.
- Kauffman, S.A. (1993) *The origins of order: Self-organization and selection in evolution.* Oxford University Press. USA.
- Kawasaki, T. and Kawai, T. (2014) Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.*, **5**.
- Khademi, M. and Nedialkov, N.S. (2015) Probabilistic Graphical Models and Deep Belief Networks for Prognosis of Breast Cancer. In, *2015 IEEE 14th International Conference on Machine Learning and Applications (ICMLA)*. IEEE, Miami, FL, USA, pp. 727–732.
- Khanna, S. *et al.* (2010) Macrophage Dysfunction Impairs Resolution of Inflammation in the Wounds of Diabetic Mice. *PLoS ONE*, **5**, e9539.
- Kim, M.-H. *et al.* (2008) Dynamics of Neutrophil Infiltration during Cutaneous Wound Healing and Infection Using Fluorescence Imaging. *Journal of Investigative Dermatology*, **128**, 1812–1820.
- Kim, N.D. and Luster, A.D. (2015) The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. *Trends in Immunology*, **36**, 547–555.
- Kim, P.S. and Lee, P.P. (2012) Modeling Protective Anti-Tumor Immunity via Preventative Cancer Vaccines Using a Hybrid Agent-based and Delay Differential Equation Approach. *PLoS Comput Biol*, **8**, e1002742.

- Kim,S. *et al.* (2004) Dynamic Bayesian network and nonparametric regression for nonlinear modeling of gene networks from time series gene expression data. *Biosystems*, **75**, 57–65.
- Kim,Y. *et al.* (2013) Regulation of Th1/Th2 cells in asthma development: A mathematical model. *Mathematical Biosciences and Engineering*, **10**, 1095–1133.
- Kirkpatrick,S. *et al.* (1983) Optimization by simulated annealing. **220**, 671–680.
- Kitano,H. (2002) Computational systems biology. **420**, 5.
- Kitano,H. ed. (2001) Foundations of systems biology MIT Press, Cambridge, Mass.
- Kitchin,R. (2014) Big Data, new epistemologies and paradigm shifts. *Big Data & Society*, **1**, 205395171452848.
- Klamt,S. *et al.* (2007) Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. *BMC Syst Biol*, **1**, 2.
- Klei,T.R.L. *et al.* (2017) From the Cradle to the Grave: The Role of Macrophages in Erythropoiesis and Erythrophagocytosis. *Front. Immunol.*, **8**.
- Knapp,S. *et al.* (2003) Alveolar Macrophages Have a Protective Antiinflammatory Role during Murine Pneumococcal Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, **167**, 171–179.
- Koch,I. *et al.* (2005) Application of Petri net theory for modelling and validation of the sucrose breakdown pathway in the potato tuber. *Bioinformatics*, **21**, 1219–1226.
- Kohyama,M. *et al.* (2009) Critical role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis.
- Kok,L. *et al.* (2022) The precursors of CD8+ tissue resident memory T cells: from lymphoid organs to infected tissues. *Nat Rev Immunol*, **22**, 283–293.
- Kolaczkowska,E. and Kubes,P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, **13**, 159–175.
- Kong,L.C. *et al.* (2013) Insulin resistance and inflammation predict kinetic body weight changes in response to dietary weight loss and maintenance in overweight and obese subjects by using a Bayesian network approach. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **98**, 1385–1394.
- Korns,D. *et al.* (2011) Modulation of Macrophage Efferocytosis in Inflammation. *Front. Immun.*, **2**.
- Kosteli,A. *et al.* (2010) Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, **120**, 3466–3479.
- Kourtzelis,I. *et al.* (2020) Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Front. Immunol.*, **11**, 553.
- Krafts,K.P. (2010) Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis*, **6**, 225–233.
- Kratofil,R.M. *et al.* (2017) Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *ATVB*, **37**, 35–42.

- Krinner,A. *et al.* (2013) Merging concepts - coupling an agent-based model of hematopoietic stem cells with an ODE model of granulopoiesis. *BMC Syst Biol*, **7**, 117.
- Krystel-Whittemore,M. *et al.* (2016) Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front. Immunol.*, **6**.
- Krzyszczuk,P. *et al.* (2018) The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front. Physiol.*, **9**, 419.
- Kubes,P. and Mehal,W.Z. (2012) Sterile Inflammation in the Liver. *Gastroenterology*, **143**, 1158–1172.
- Kumar,M. *et al.* (2010) Genetic Algorithm: Review and Application. *SSRN Journal*.
- Lakatta,E.G. and Levy,D. (2003) Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part II: The Aging Heart in Health: Links to Heart Disease. *Circulation*, **107**, 346–354.
- Lau,R.Y. and Guo,X. (2011) A Review on Current Osteoporosis Research: With Special Focus on Disuse Bone Loss. *Journal of Osteoporosis*, **2011**, 1–6.
- Laurens,N. *et al.* (2006) Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost*, **4**, 932–939.
- Laurent,P. *et al.* (2017) Immune-Mediated Repair: A Matter of Plasticity. *Front. Immunol.*, **8**, 454.
- Le Blanc,J. and Lordkipanidzé,M. (2019) Platelet Function in Aging. *Front. Cardiovasc. Med.*, **6**, 109.
- Lee,C.Z.W. and Ginhoux,F. (2022) Biology of resident tissue macrophages. *Development*, **149**, dev200270.
- Leibovich,S.J. and Ross,R. (1975) The Role of the Macrophage in Wound Repair. **78**.
- Lemoine,M. (2021) The Evolution of the Hallmarks of Aging. *Front. Genet.*, **12**, 693071.
- Lenz,K.M. and Nelson,L.H. (2018) Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function. *Front. Immunol.*, **9**, 698.
- Levchenko,A. *et al.* (2000) Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 5818–5823.
- Li,D. and Wu,M. (2021) Pattern recognition receptors in health and diseases. *Sig Transduct Target Ther*, **6**, 291.
- Li,F. *et al.* (2004) The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 4781–4786.
- Li,H. *et al.* (2010) Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells. *Blood*, **116**, 210–217.
- Li,J. *et al.* (2018) Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front. Immunol.*, **9**, 585.
- Li,X. *et al.* (2019) Computational Modeling of the Crosstalk Between Macrophage Polarization

- and Tumor Cell Plasticity in the Tumor Microenvironment. *Front. Oncol.*, **9**, 10.
- Li,Z. *et al.* (2021) Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology*, **22**, 165–187.
- Linehan,E. and Fitzgerald,D. (2015) Ageing and the immune system: focus on macrophages. *European Journal of Microbiology and Immunology*, **5**, 14–24.
- Liu,F. *et al.* (2022) A system pharmacology Boolean network model for the TLR4-mediated inflammatory response in early sepsis. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, **49**, 645–655.
- Liu,F. *et al.* (2016) Fuzzy Stochastic Petri Nets for Modeling Biological Systems with Uncertain Kinetic Parameters. *PLoS ONE*, **11**, e0149674.
- Liu,H. *et al.* (2016) Neurotransmitter receptors on microglia. *Stroke Vasc Neurol*, **1**, 52–58.
- Liu,H.-C. *et al.* (2017) Fuzzy Petri nets for knowledge representation and reasoning: A literature review. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, **60**, 45–56.
- López-Otín,C. *et al.* (2013) The Hallmarks of Aging. *Cell*, **153**, 1194–1217.
- Louiselle,A.E. *et al.* (2021) Macrophage polarization and diabetic wound healing. *Translational Research*, **236**, 109–116.
- Lu,C.-Y. *et al.* (2020) Macrophage-Derived Vascular Endothelial Growth Factor-A Is Integral to Neuromuscular Junction Reinnervation after Nerve Injury. *J. Neurosci.*, **40**, 9602–9616.
- Lucas,T. *et al.* (2010) Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *J.I.*, **184**, 3964–3977.
- Luo,J. *et al.* (2018) TRPV4 Channel Signaling in Macrophages Promotes Gastrointestinal Motility via Direct Effects on Smooth Muscle Cells. *Immunity*, **49**, 107-119.e4.
- Macal,C. and North,M. (2014) Introductory tutorial: Agent-based modeling and simulation. *In proceedings of the winter simulation conference 2014. IEEE*, 6–20.
- Machiels,B. *et al.* (2017) A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat Immunol*, **18**, 1310–1320.
- Madel,M.-B. *et al.* (2019) Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions. *Front. Immunol.*, **10**, 1408.
- Madsen,A.L. *et al.* (2003) The Hugin Tool for Learning Bayesian Networks. In, Nielsen,T.D. and Zhang,N.L. (eds), *Symbolic and Quantitative Approaches to Reasoning with Uncertainty*, Lecture Notes in Computer Science. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 594–605.
- Mahasa,K.J. *et al.* (2016) Mathematical model of tumor–immune surveillance. *Journal of Theoretical Biology*, **404**, 312–330.
- Mahlbacher,G.E. *et al.* (2019) Mathematical modeling of tumor-immune cell interactions. *Journal of Theoretical Biology*, **469**, 47–60.

- Malthus,T.R. (1798) Essai sur le principe de population J.-M. Tremblay, Chicoutimi.
- Malvin,N.P. *et al.* (2012) Colonic epithelial response to injury requires Myd88 signaling in myeloid cells. *Mucosal Immunol*, **5**, 194–206.
- Mantovani,A. *et al.* (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, **23**, 549–555.
- Mantovani,A. *et al.* (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, **25**, 677–686.
- Marcot,B.G. and Penman,T.D. (2019) Advances in Bayesian network modelling: Integration of modelling technologies. *Environmental Modelling & Software*, **111**, 386–393.
- Martinez,F.O. and Gordon,S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, **6**.
- Maucher,M. *et al.* (2011) Inferring Boolean network structure via correlation. *Bioinformatics*, **27**, 1529–1536.
- McHugh,D. and Gil,J. (2018) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The Journal of Cell Biology*, **217**, 65–77.
- McKendrick,A.G. and Kermack,W.G. (1927) A contribution to the mathematical theory of epidemics. 22.
- Medzhitov,R. (2010) Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, **140**, 771–776.
- Meizlish,M.L. *et al.* (2021) Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, **39**, 557–581.
- Metzcar,J. *et al.* (2019) A Review of Cell-Based Computational Modeling in Cancer Biology. *JCO Clinical Cancer Informatics*, 1–13.
- Metzemaekers,M. *et al.* (2020) Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol*, **17**, 433–450.
- Michell-Robinson,M.A. *et al.* (2015) Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*, **138**, 1138–1159.
- Mills,C.D. *et al.* (2000) M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol*, **164**, 6166–6173.
- Min,C. *et al.* (2020) Tim-4 functions as a scavenger receptor for phagocytosis of exogenous particles. *Cell Death Dis*, **11**, 561.
- Minogue,A.M. *et al.* (2014) Age-associated dysregulation of microglial activation is coupled with enhanced blood-brain barrier permeability and pathology in APP/PS1 mice. *Neurobiology of Aging*, **35**, 1442–1452.
- Mirza,R. *et al.* (2009) Selective and Specific Macrophage Ablation Is Detrimental to Wound Healing in Mice. *The American Journal of Pathology*, **175**, 2454–2462.

- Misharin,A.V. *et al.* (2017) Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *Journal of Experimental Medicine*, **214**, 2387–2404.
- Mitra,E.D. *et al.* (2018) Using both qualitative and quantitative data in parameter identification for systems biology models. *Nat Commun*, **9**, 3901.
- Mitra,E.D. and Hlavacek,W.S. (2019) Parameter Estimation and Uncertainty Quantification for Systems Biology Models.
- Miyamoto,T. (2013) Role of osteoclasts in regulating hematopoietic stem and progenitor cells. *WJO*, **4**, 198.
- Mochan,E. *et al.* (2014) A mathematical model of intrahost pneumococcal pneumonia infection dynamics in murine strains. *Journal of Theoretical Biology*, **353**, 44–54.
- Moré,J.J. (1978) The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory. In, Watson,G.A. (ed), *Numerical Analysis*, Lecture Notes in Mathematics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 105–116.
- Moyo,D. *et al.* (2018) Macrophage Transactivation for Chemokine Production Identified as a Negative Regulator of Granulomatous Inflammation Using Agent-Based Modeling. *Front. Immunol.*, **9**, 637.
- Mu,X. *et al.* (2021) Tissue-Resident Macrophages in the Control of Infection and Resolution of Inflammation. *Shock*, **55**, 14–23.
- Muller,P.A. *et al.* (2014) Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility. *Cell*, **158**, 300–313.
- Murphy,K.P. (2002) Dynamic Bayesian Networks : Representation, Inference and Learning. *thèse de doct.*
- Murray,R.Z. and Stow,J.L. (2014) Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking. *Front. Immunol.*, **5**.
- Murtha,L.A. *et al.* (2019) The Role of Pathological Aging in Cardiac and Pulmonary Fibrosis. *Aging and disease*, **10**, 419.
- Müssel,C. *et al.* (2010) BoolNet—an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*, **26**, 1378–1380.
- Nagashima,R. *et al.* (1996) Lamina propria macrophages in the human gastrointestinal mucosa: their distribution, immunohistological phenotype, and function. *J Histochem Cytochem.*, **44**, 721–731.
- Needham,C.J. *et al.* (2007) A Primer on Learning in Bayesian Networks for Computational Biology. *PLoS Comput Biol*, **3**, e129.
- Netz,R.R. and Eaton,W.A. (2021) Estimating computational limits on theoretical descriptions of biological cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **118**, e2022753118.
- Newson,J. *et al.* (2014) Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*, **124**, 1748–1764.

- Nguyen-Lefebvre,A.T. and Horuzsko,A. (2016) Kupffer Cell Metabolism and Function.
- Ni,Z. *et al.* (2011) Exploring Bayesian Belief Networks Using Netica®. In, Darzi,A. and Athanasiou,T. (eds), *Evidence Synthesis in Healthcare*. Springer London, London, pp. 293–318.
- Nimmerjahn,A. *et al.* (2005) Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, **308**, 1314–1318.
- Norton,K.-A. *et al.* (2019) Multiscale Agent-Based and Hybrid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Processes*, **7**, 37.
- Novak,M.L. and Koh,T.J. (2013a) Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of Leukocyte Biology*, **93**, 875–881.
- Novak,M.L. and Koh,T.J. (2013b) Phenotypic Transitions of Macrophages Orchestrate Tissue Repair. *The American Journal of Pathology*, **183**, 1352–1363.
- Ojha,R. *et al.* (2018) Bayesian network modelling for supply chain risk propagation. *International Journal of Production Research*, **56**, 5795–5819.
- de Oliveira,M.H. *et al.* (2021) Mathematical modelling, parameter estimation and computational simulation for skin wound healing under Copaiferalangsdorffi treatments. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, **199**, 105915.
- Opneja,A. *et al.* (2019) Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thrombosis Research*, **179**, 56–63.
- Ortega-Gómez,A. *et al.* (2013) Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, **5**, 661–674.
- Osman,I.H. and Kelly,J.P. (1997) Meta-Heuristics Theory and Applications. *Journal of the Operational Research Society*, **48**, 657–657.
- Ougrinovskaia,A. *et al.* (2010) An ODE Model of Early Stages of Atherosclerosis: Mechanisms of the Inflammatory Response. *Bull. Math. Biol.*, **72**, 1534–1561.
- Palmieri,E.M. *et al.* (2020) Nitric Oxide in Macrophage Immunometabolism: Hiding in Plain Sight. *Metabolites*, **10**, 429.
- Palumbo,R. *et al.* (2004) Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *Journal of Cell Biology*, **164**, 441–449.
- Panizzi,P. *et al.* (2010) Impaired Infarct Healing in Atherosclerotic Mice With Ly-6Chi Monocytosis. *Journal of the American College of Cardiology*, **55**, 1629–1638.
- Parkhurst,C.N. *et al.* (2013) Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell*, **155**, 1596–1609.
- Parkin,J. and Cohen,B. (2001) An overview of the immune system. *The Lancet*, **357**, 1777–1789.
- Patel,A.A. *et al.* (2017) The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, **214**, 1913–1923.

- Pearl,J. (1985) Bayesian network: A model of self-activated memory for evidential reasoning. *Proceedings of the 7th conference of the Cognitive Science Society, University of California.*
- Pederson,L. *et al.* (2008) Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 20764–20769.
- Phillipson,M. and Kubes,P. (2019) The Healing Power of Neutrophils. *Trends in Immunology*, **40**, 635–647.
- Pigozzo,A.B. *et al.* (2013) On the computational modeling of the innate immune system. *BMC Bioinformatics*, **14**, S7.
- Pinu,F.R. *et al.* (2019) Systems Biology and Multi-Omics Integration: Viewpoints from the Metabolomics Research Community. *Metabolites*, **9**, 76.
- Pocock,J.M. and Kettenmann,H. (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, **30**, 527–535.
- Poglio,S. *et al.* (2012) In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood*, **120**, 4952–4962.
- Polak,M.E. *et al.* (2017) Petri Net computational modelling of Langerhans cell Interferon Regulatory Factor Network predicts their role in T cell activation. *Sci Rep*, **7**, 668.
- Pollino,C.A. *et al.* (2007) Parameterisation and evaluation of a Bayesian network for use in an ecological risk assessment. *Environmental Modelling & Software*, **22**, 1140–1152.
- Qian,G. and Mahdi,A. (2020) Sensitivity analysis methods in the biomedical sciences. *Mathematical Biosciences*, **323**, 108306.
- Rabiller,L. *et al.* (2021) Driving regeneration, instead of healing, in adult mammals: the decisive role of resident macrophages through efferocytosis. *npj Regen Med*, **6**, 41.
- Rajesh,A. *et al.* (2019) The role of Langerhans cells in pathologies of the skin. *Immunol Cell Biol*, **97**, 700–713.
- Ramachandran,P. *et al.* (2012) Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109**.
- Ranganathan,A. (2004) The Levenberg-Marquardt Algorithm. *Tutorial on LM algorithm*, **11**.
- Rathinam,V.A.K. and Fitzgerald,K.A. (2016) Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell*, **165**, 792–800.
- Ravichandran,K.S. (2010) Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *Journal of Experimental Medicine*, **207**, 1807–1817.
- Rea,I.M. *et al.* (2018) Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front. Immunol.*, **9**, 586.
- Reddy,V.N. *et al.* (1996) Qualitative analysis of biochemical reaction systems. *Computers in*

- Biology and Medicine*, **26**, 9–24.
- Regev, A. *et al.* (2001) Representation and simulation of biochemical processes using the π -calculus process algebra. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 12.
- Reynolds, A. *et al.* (2006) A reduced mathematical model of the acute inflammatory response: I. Derivation of model and analysis of anti-inflammation. *Journal of Theoretical Biology*, **242**, 220–236.
- Ribeiro, E.H. *et al.* (2019) Stochastic Petri Net Models for the Study of Macrophage Reprogramming. In, *2019 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM)*. IEEE, San Diego, CA, USA, pp. 2184–2191.
- Rikard, S.M. *et al.* (2019) Multiscale Coupling of an Agent-Based Model of Tissue Fibrosis and a Logic-Based Model of Intracellular Signaling. *Front. Physiol.*, **10**, 1481.
- Roche, P.A. and Furuta, K. (2015) The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol*, **15**, 203–216.
- Rosadini, C.V. and Kagan, J.C. (2017) Early innate immune responses to bacterial LPS. *Current Opinion in Immunology*, **44**, 14–19.
- Ruder, S. (2017) An overview of gradient descent optimization algorithms.
- Ruiz-Martinez, A. *et al.* (2022) Simulations of tumor growth and response to immunotherapy by coupling a spatial agent-based model with a whole-patient quantitative systems pharmacology model. *PLoS Comput Biol*, **18**, e1010254.
- Sabroe, I. *et al.* (2008) The role of TLR activation in inflammation. *J. Pathol.*, **214**, 126–135.
- Sagaradze, G.D. *et al.* (2020) Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 576176.
- Saltelli, A. and Annoni, P. (2010) How to avoid a perfunctory sensitivity analysis. *Environmental Modelling & Software*, **25**, 1508–1517.
- San León, D. and Nogales, J. (2022) Toward merging bottom–up and top–down model-based designing of synthetic microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, **69**, 102169.
- van der Sande, M. *et al.* (2020) A cell-based boundary model of gastrulation by unipolar ingression in the hydrozoan cnidarian *Clytia hemisphaerica*. *Developmental Biology*, **460**, 176–186.
- Saxena, A. *et al.* (2008) Damage Propagation Modeling for Aircraft Engine Prognostics. *IEEE*, 9.
- Sayed, N. *et al.* (2021) An inflammatory aging clock (iAge) based on deep learning tracks multimorbidity, immunosenescence, frailty and cardiovascular aging. *Nat Aging*, **1**, 598–615.
- Schafer, D.P. *et al.* (2012) Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, **74**, 691–705.

- Schaub, M.A. *et al.* (2007) Qualitative networks: a symbolic approach to analyze biological signaling networks. *BMC Syst Biol*, **1**, 4.
- Schirm, S. *et al.* (2016) A Biomathematical Model of Pneumococcal Lung Infection and Antibiotic Treatment in Mice. *PLoS ONE*, **11**, e0156047.
- Schmauck-Medina, T. *et al.* (2022) New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Ageing*, **14**, 6829–6839.
- Schultz, G.S. *et al.* (2011) Dynamic reciprocity in the wound microenvironment: Dynamic reciprocity in wounds. *Wound Repair and Regeneration*, **19**, 134–148.
- Schuster, S. *et al.* (2002) Exploring the pathway structure of metabolism: decomposition into subnetworks and application to *Mycoplasma pneumoniae*. *Bioinformatics*, **18**, 351–361.
- Schwab, J.D. *et al.* (2020) Concepts in Boolean network modeling: What do they all mean? *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **18**, 571–582.
- Schwab, J.M. *et al.* (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*, **447**, 869–874.
- Scott, A. (2004) What is ‘inflammation’? Are we ready to move beyond Celsus? *British Journal of Sports Medicine*, **38**, 248–249.
- Semple, J.W. *et al.* (2011) Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*, **11**, 264–274.
- Serhan, C.N. (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, **510**, 92–101.
- Serhan, C.N. *et al.* (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB j.*, **21**, 325–332.
- Serhan, C.N. *et al.* (2015) The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology*, **27**, 200–215.
- Serhan, C.N. and Savill, J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, **6**, 1191–1197.
- Shapouri-Moghaddam, A. *et al.* (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, **233**, 6425–6440.
- Shi, C. and Pamer, E.G. (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, **11**, 762–774.
- Shmulevich, I., Dougherty, E.R., and Zhang, W. (2002) Gene perturbation and intervention in probabilistic Boolean networks. *Bioinformatics*, **18**, 1319–1331.
- Shmulevich, I., Dougherty, E.R., Kim, S., *et al.* (2002) Probabilistic Boolean networks: a rule-based uncertainty model for gene regulatory networks. *Bioinformatics*, **18**, 261–274.
- Sica, A. and Mantovani, A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.*, **122**, 787–795.
- Silva, M.R.E. (1978) A brief survey of the history of inflammation. *Agents and actions*, **8**, 45–49.

- Silva,P.C.L. *et al.* (2020) COVID-ABS: An agent-based model of COVID-19 epidemic to simulate health and economic effects of social distancing interventions. *Chaos, Solitons & Fractals*, **139**, 110088.
- Smith,P.D. *et al.* (2011) Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol*, **4**, 31–42.
- Soehnlein,O. *et al.* (2008) Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, **112**, 1461–1471.
- Sousa,C. *et al.* (2017) Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Front. Immunol.*, **8**.
- Stadler,P.F. and Happel,R. (1999) Random field models for fitness landscapes. *Journal of Mathematical Biology*.
- Standeven,K.F. *et al.* (2005) The molecular physiology and pathology of fibrin structure/function. *Blood Reviews*, **19**, 275–288.
- von Stebut,E. *et al.* (2003) Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1 α/β released from neutrophils recruited by mast cell–derived TNF α . *Blood*, **101**, 210–215.
- Stojadinovic,O. *et al.* (2013) Increased number of Langerhans cells in the epidermis of diabetic foot ulcers correlates with healing outcome. *Immunol Res*, **57**, 222–228.
- Su,Q. *et al.* (2020) Brief communication: Long-term absence of Langerhans cells alters the gene expression profile of keratinocytes and dendritic epidermal T cells. *PLoS ONE*, **15**, e0223397.
- Sugimoto,M.A. *et al.* (2016) Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front. Immunol.*, **7**.
- Sukhbaatar,N. and Weichhart,T. (2018) Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals*, **11**, 137.
- Swat,M.H. *et al.* (2012) Multi-Scale Modeling of Tissues Using CompuCell3D. In, *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 325–366.
- Taban,Q. *et al.* (2022) Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action. *Cell Commun Signal*, **20**, 2.
- Tercan,B. *et al.* (2022) Probabilistic boolean networks predict transcription factor targets to induce transdifferentiation. *iScience*, **25**, 104951.
- Terpstra,V. and van Berkel,T.J.C. (2000) Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. *Blood*, **95**, 2157–2163.
- Tesfatsion,L. (2006) Agent-based computational economics: A constructive approach to economic theory. *Handbook of computational economics*, **2**, 831–880.
- Theurl,I. *et al.* (2016) On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat Med*, **22**, 945–951.

- Thomas,R. (1973) Boolean Formalization of Genetic Control Circuits. *J. theor. Biol.*, **23**.
- Tisue,S. and Wilensky,U. (2004) NetLogo: A Simple Environment for Modeling Complexity. **10**.
- Torres,M. *et al.* (2019) Identifying important parameters in the inflammatory process with a mathematical model of immune cell influx and macrophage polarization. *PLoS Comput Biol*, **15**, e1007172.
- Trapnell,B.C. and Whitsett,J.A. (2002) GM-CSF Regulates Pulmonary Surfactant Homeostasis and Alveolar Macrophage-Mediated Innate Host Defense. *Annu. Rev. Physiol.*, **64**, 775–802.
- Treffkorn,L. *et al.* (2004) PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF- α , ET-1, IL-1 α , IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, **74**, 113–123.
- Tremblay,M.-È. *et al.* (2010) Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biol*, **8**, e1000527.
- Uribe-Querol,E. and Rosales,C. (2020) Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.*, **11**, 1066.
- Van Gassen,N. *et al.* (2015) Macrophage dynamics are regulated by local macrophage proliferation and monocyte recruitment in injured pancreas: Innate immunity. *Eur. J. Immunol.*, **45**, 1482–1493.
- Varga-Szabo,D. *et al.* (2008) Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. *ATVB*, **28**, 403–412.
- Vénéreau,E. *et al.* (2015) DAMPs from Cell Death to New Life. *Front. Immunol.*, **6**.
- Venter,G. (2010) Review of Optimization Techniques. In, Blockley,R. and Shyy,W. (eds), *Encyclopedia of Aerospace Engineering*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, p. eae495.
- Verbraeken,J. *et al.* (2021) A Survey on Distributed Machine Learning. *ACM Comput. Surv.*, **53**, 1–33.
- Verduijn,M. *et al.* (2007) Prognostic Bayesian networks. *Journal of Biomedical Informatics*, **40**, 609–618.
- Versteeg,H.H. *et al.* (2013) New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews*, **93**, 327–358.
- Vezzani,A. and Viviani,B. (2015) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*, **96**, 70–82.
- Villaverde,A.F. *et al.* (2022) A protocol for dynamic model calibration. *Briefings in Bioinformatics*, **23**, bbab387.
- Viola,M.F. and Boeckxstaens,G. (2020) Intestinal resident macrophages: Multitaskers of the gut. *Neurogastroenterology & Motility*, **32**.
- Virgilio,K.M. *et al.* (2018) Agent-based model illustrates the role of the microenvironment in

- regeneration in healthy and *mdx* skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, **125**, 1424–1439.
- de Visser, J.A.G.M. and Krug, J. (2014) Empirical fitness landscapes and the predictability of evolution. *Nat Rev Genet*, **15**, 480–490.
- Volterra, V. (1927) Une théorie mathématique de la lutte pour la vie Scientia.
- Wake, H. *et al.* (2009) Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *Journal of Neuroscience*, **29**, 3974–3980.
- Wang, J. *et al.* (2017) Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science*, **358**, 111–116.
- Wang, Y. *et al.* (2015) Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from Kupffer cells. *Hepatology*, **62**, 1710–1722.
- Watanabe, S. *et al.* (2019) The role of macrophages in the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, **129**, 2619–2628.
- Wculek, S.K. *et al.* (2022) Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. *Cell Mol Immunol*, **19**, 384–408.
- Wen, Y. *et al.* (2021) Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities. *Cell Mol Immunol*, **18**, 45–56.
- West, A.P. *et al.* (2011) TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, **472**, 476–480.
- West, H.C. and Bennett, C.L. (2018) Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin. *Front. Immunol.*, **8**, 1941.
- Westergaard, M. and Kristensen, L.M. (2009) The Access/CPN Framework: A Tool for Interacting with the CPN Tools Simulator. In, Franceschinis, G. and Wolf, K. (eds), *Applications and Theory of Petri Nets*, Lecture Notes in Computer Science. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 313–322.
- Wilkinson, H.N. and Hardman, M.J. (2020) Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.*, **10**, 200223.
- Winterbourn, C.C. *et al.* (2016) Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 765–792.
- Wolf, S. *et al.* (2013) A multi-agent model of several economic regions. *Environmental Modelling & Software*, **44**, 25–43.
- Wynn, T.A. *et al.* (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, **496**, 445–455.
- Wynn, T.A. and Ramalingam, T.R. (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*, **18**, 1028–1040.
- Yang, D. *et al.* (2017) Alarmins and immunity. *Immunol Rev*, **280**, 41–56.

- Yang,D. *et al.* (2007) High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *Journal of Leukocyte Biology*, **81**, 59–66.
- Yatim,N. *et al.* (2015) RIPK1 and NF- κ B signaling in dying cells determines cross-priming of CD8⁺ T cells. *Science*, **350**, 328–334.
- Yu,J.S. and Bagheri,N. (2016) Multi-class and multi-scale models of complex biological phenomena. *Current Opinion in Biotechnology*, **39**, 167–173.
- Yue,Z. *et al.* (2021) Tissue-resident macrophage inflammaging aggravates homeostasis dysregulation in age-related diseases. *Cellular Immunology*, **361**, 104278.
- Yun,M. (2015) Changes in Regenerative Capacity through Lifespan. *IJMS*, **16**, 25392–25432.
- Yunna,C. *et al.* (2020) Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, **877**, 173090.
- Zandonà,A. *et al.* (2019) A Dynamic Bayesian Network model for the simulation of Amyotrophic Lateral Sclerosis progression. *BMC Bioinformatics*, **20**, 118.
- Zani,I. *et al.* (2015) Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells*, **4**, 178–201.
- Zhang,H. *et al.* (2016) Data-driven agent-based modeling, with application to rooftop solar adoption. *Auton Agent Multi-Agent Syst*, **30**, 1023–1049.
- Zhao,R. *et al.* (2016) Inflammation in Chronic Wounds. *IJMS*, **17**, 2085.
- Zhong,Y. *et al.* (2013) Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front. Immunol.*, **4**.
- Zhou,J. *et al.* (2020) Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front. Oncol.*, **10**, 188.
- Zindel,J. and Kubes,P. (2020) DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, **15**, 493–518.
- Zou,M. and Conzen,S.D. (2005) A new dynamic Bayesian network (DBN) approach for identifying gene regulatory networks from time course microarray data. *Bioinformatics*, **21**, 71–79.

Annexes

ARTICLE OPEN



Driving regeneration, instead of healing, in adult mammals: the decisive role of resident macrophages through efferocytosis

Lise Rabiller^{1,5,8}, Virginie Robert^{1,8}, Adèle Arlat^{1,6,9,9}, Elodie Labit^{1,7,9}, Marielle Ousset^{1,6}, Marie Salon^{2,6}, Agnès Coste^{2,6}, Léa Da Costa-Fernandes^{1,6}, Paul Monsarrat^{1,6}, Bruno Ségui³, Mireille André^{1,6}, Christophe Guissard^{1,6}, Marie-Laure Renoud^{1,6}, Marine Silva⁴, Gilles Mithieux⁴, Isabelle Raymond-Letron^{1,6}, Luc Pénicaud¹, Anne Lorsignol^{1,6}, Louis Casteilla^{1,6}, Cécile Dromard Berthézène^{1,6} and Béatrice Cousin^{1,6}✉

Tissue repair after lesion usually leads to scar healing and thus loss of function in adult mammals. In contrast, other adult vertebrates such as amphibians have the ability to regenerate and restore tissue homeostasis after lesion. Understanding the control of the repair outcome is thus a concerning challenge for regenerative medicine. We recently developed a model of induced tissue regeneration in adult mice allowing the comparison of the early steps of regenerative and scar healing processes. By using studies of gain and loss of function, specific cell depletion approaches, and hematopoietic chimeras we demonstrate here that tissue regeneration in adult mammals depends on an early and transient peak of granulocyte producing reactive oxygen species and an efficient efferocytosis specifically by tissue-resident macrophages. These findings highlight key and early cellular pathways able to drive tissue repair towards regeneration in adult mammals.

npj Regenerative Medicine (2021)6:41 | <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00151-1>

INTRODUCTION

Repair processes following tissue injury result either in regeneration or in scar formation. Whereas scar healing commonly leads to the loss of functional tissue and fibrous scar development, regeneration completely recapitulates the original tissue architecture and function. The understanding of the control of repair outcome is, therefore, a concerning challenge for regenerative medicine¹.

Regeneration has mostly been studied in lower vertebrates and in newborn mammals, since adult mammals do not regenerate, and instead heal tissue damages with a scar except in specific strains such as the spiny mouse² or the MRL/MPJ mouse³. Most of the studies dealing with tissue repair in adult mammals thus recapitulate the healing process and not regeneration. In a recently developed model of tissue lesion, relying on massive resection of the subcutaneous fat pad, we have been able to induce adipose tissue (AT) regeneration in adult mice. By using this model to compare the regenerative and scar healing processes, we demonstrated that regeneration is controlled through the generation of an early, large, and transient peak of reactive oxygen species (ROS)⁴. Because ROS act as both signaling molecules and mediators of inflammation⁵, our findings suggested a peculiar role of the inflammatory process in tissue regeneration in adult mammals as it has been demonstrated in lower vertebrates⁶.

At a cellular scale, granulocytic neutrophils and macrophages are the key players in the inflammatory process. In both lower vertebrates and mammals, no study has yet demonstrated the role of neutrophils in regeneration. In contrast, macrophages have been involved in regeneration in salamander⁷, neonatal mice in a

myocardial infarction model⁸, as well as in adults in a digitip amputation context or in *Acomys* mice⁹. The phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages via a process called efferocytosis is one of the main mechanisms contributing to the resolution of inflammation in physiological situations¹⁰. This overall process is partly orchestrated by pro-and anti-inflammatory cytokines as well as eicosanoids such as prostaglandins and leukotrienes that therefore contribute to control tissue repair¹¹.

Recent studies have highlighted the complexity of the macrophage population, by identifying the roles of functionally distinct macrophage subsets in tissue homeostasis and tissue repair^{12–15}. Indeed, bone marrow (BM) derived monocytes recruited after tissue lesion are pro-inflammatory and exhibit tissue-destructive activity, whereas tissue-resident populations are pro-resolutive and drive tissue repair¹⁶. Like other adult tissues, the AT hosts distinct populations of macrophages displaying unique tissue distributions, transcriptional profiles, and functions and have distinct origins^{17,18}. Among the origins, we have demonstrated that in adult mice, AT-macrophages belong to a specific and quantitatively significant hematopoietic process, relying on the presence of peculiar hematopoietic stem cells inside the AT^{19,20}. Interestingly, disruption of endogenous AT hematopoiesis leads to inflammatory macrophages production that specifically contributes to chronic inflammation and AT dysfunction in contrast to macrophages derived from the BM²¹. These results suggest that in the AT, macrophages may promote beneficial or detrimental effects on tissue homeostasis depending on their local or medullar origin.

We thus hypothesized here that the early inflammatory phase following injury is crucial in the tissue repair outcome and we

¹STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France. ²UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France. ³UMR 1037, Centre de recherche en cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, INSERM, UPS, Toulouse, France. ⁴Inserm U1213, Université Lyon 1, Villeurbanne, France. ⁵Present address: Department of Physiology and Cell Information Systems, McGill University, Montreal; Alan Edwards Center for Research on Pain, McGill University, Montreal, QC, Canada. ⁶Present address: RESTORE Institute, UMR 1301-Inserm 5070-CNRS EFS Univ. P. Sabatier, Toulouse, France. ⁷Present address: Department of Comparative Biology and Experimental Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada. ⁸These authors contributed equally: Lise Rabiller, Virginie Robert. ⁹These authors jointly supervised this work: Adele Arlat, Elodie Labit. ✉email: beatrice.cousin@inserm.fr

investigated the precise role of granulocytes and macrophages in tissue regeneration in adult mammals with a focus on macrophage origin. By using *in vivo* gain or loss of function studies, we show here that a rapid and transient peak of ROS-producing granulocytes is required for regeneration. In addition, macrophages derived from AT-hematopoiesis direct the repair process towards regeneration due to their efficient efferocytosis, in contrast to medullar macrophages that nurture inflammation and thus promote scar healing.

RESULTS

Regenerative healing is characterized by an early and transient inflammation

To analyze the role of the inflammatory response in the outcome of tissue lesion, we used the previously validated model of subcutaneous AT (scAT) resection⁴. Massive resection of scAT followed by treatment with NaCl or Naloxone Methiodide (NaIM), an antagonist of opioid receptors, resulted in scar healing or regeneration, respectively, one month post-resection as previously described⁴. As expected and compared to NaCl (control) mice that exhibit scar healing, NaIM treatment-induced macroscopic scAT regeneration (Fig. 1a) is associated with an increased weight ratio between the resected scAT and its contralateral uninjured counterpart (Fig. 1b). Regeneration was associated with the presence of unilocular fully differentiated adipocytes and new vessel formation as revealed by BODIPY and lectin staining, respectively (Fig. 1c). In contrast, scar healing was characterized by strong collagen fibers deposition as revealed by Second-Harmonic Generation imaging, and the absence of adipocyte differentiation (Fig. 1c).

We first determined the temporal and dynamic inflammatory response to surgical tissue resection in both scar (NaCl) and regenerative (NaIM) healing conditions. Compared to scar healing, regenerative condition was characterized by a significant and transient increase in the expression of pro-inflammatory cytokines such as interleukin (Il)1 β , Il6 and tumor necrosis factor- α (Tnfa) as well as anti-inflammatory cytokines such as transforming growth factor- β (Tgf β) and Il10, 6 h post-resection, in the resection plane (Fig. 1d). This upregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines was associated with a significant increase in expression of enzymes involved in the production of pro-inflammatory lipid mediators (Cox-2, Pge2 synthase), and to a lesser extent in Pgd2 synthase but not in the expression of enzymes involved in the leukotriene production (Alox5, Lta4h) (Fig. 1e). The induction of Cox-2 and Pge2 synthase expression was reflected by an increased ratio between prostaglandins (PG) E2 and D2 12 h post-resection (Fig. 1f). We then used heatmap visualization (Fig. 1g) and principal component analysis (PCA) (Fig. 1h-j) to determine whether regenerative and scar healing conditions can be characterized by a global gene signature. The heatmap of the expression of 12 genes (cytokines and lipid mediator synthesis enzymes) 6 h post-resection (Fig. 1g), highlighted a differential expression pattern between regenerative and scar healing conditions. PCA was then used to reduce the dimensionality of the dataset while retaining most of its original variability. Consequently, we reduced a set of correlated variables (the gene expressions) into fewer uncorrelated variables (the dimensions). The projection of the data into this new set of dimensions revealed a clear clustering between the two groups on the first and second dimensions 2 and 6 h post-resection (Fig. 1h, i), although the discrimination is clearer at 6 h than at 2 h post-resection between regenerative and scar healing conditions, as revealed by the principal components that account for 67% of the variability of the data at 2 h post-resection while it accounts for 75% at 6 h post-resection (Fig. 1h, i). Interestingly this clustering completely disappears 12 h post-resection (Fig. 1j). We thus

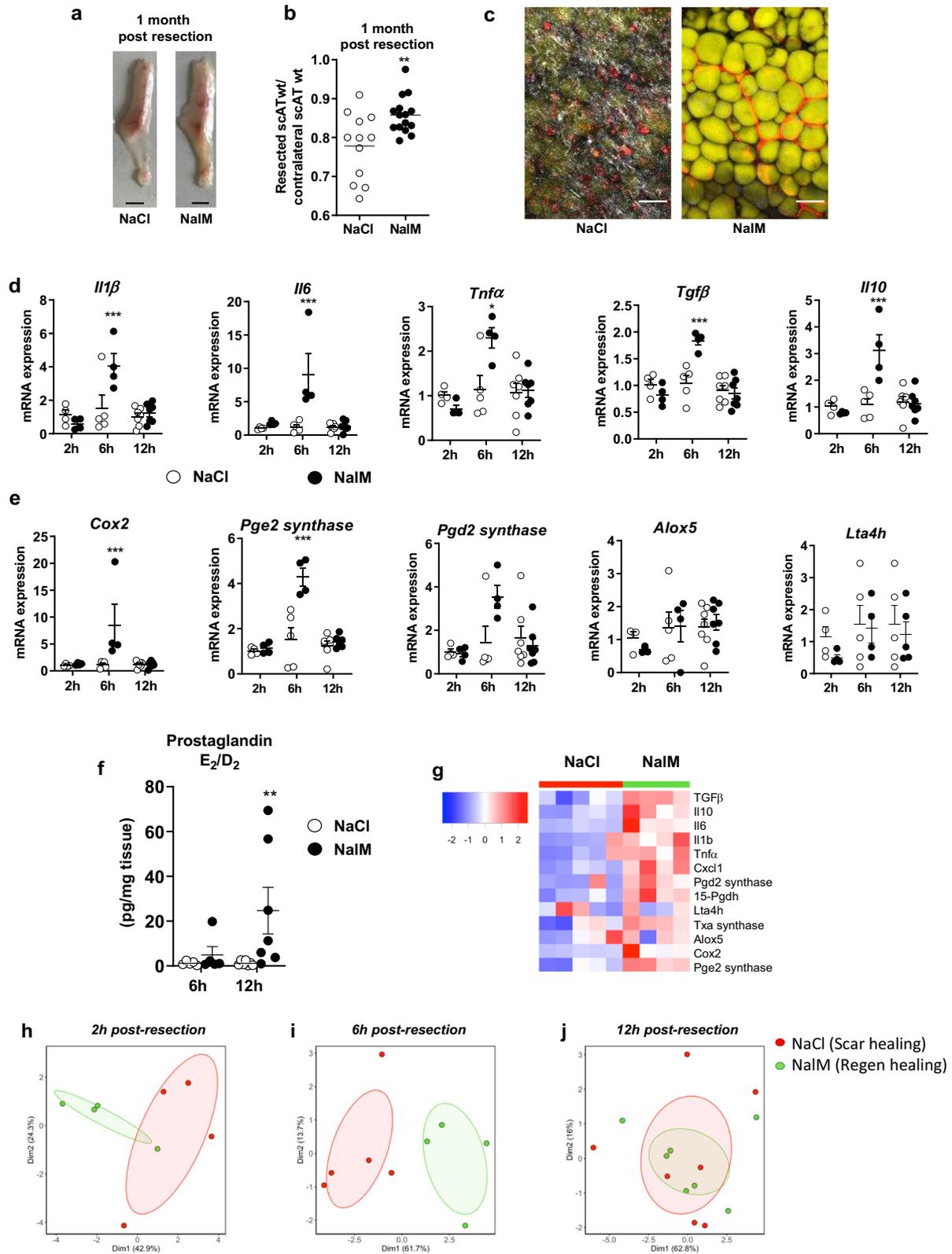
demonstrated here that an early but transient inflammation is associated with regeneration, and that a specific pattern of gene expression 6 h post-resection may be predictive of the regenerative outcome.

Regenerative healing depends on ROS production by neutrophils

The early inflammation was associated with an infiltration of the resection plane by small round leukocytes, of typical granulocytic neutrophil morphology (segmented or ringform nucleus with condensed chromatin and pale cytoplasm) (Fig. 2a, zoom). The granulocytic infiltration was observed in both the connective tissue and in the scAT (mainly as intravascular leukostasis and perivascular cuffs) in the resection plane (Fig. 2a), as demonstrated by histological evaluation. The nature of infiltrating leukocytes was confirmed by flow cytometry. Both neutrophils and monocytes were identified as CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6G⁺/Ly6C⁻ and CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6G⁻/Ly6C⁺, respectively (Fig. 2b), following the gating strategy shown in Supplementary Fig. 1a. Neutrophils, but not monocytes, increased in the resection plane 6 h post-resection in regenerative compared to scar healing conditions (Fig. 2a, b). Moreover, the expression of Cxcl1, a chemokine that in parallel to TNF α induces the infiltration of neutrophils²², was significantly and transiently increased in the injured scAT during regeneration (Fig. 2c).

To unravel the role of granulocytes in the NaIM-induced regeneration process, their specific depletion was undertaken *in vivo* using an anti-Gr1 blocking antibody. We first verified that Gr-1 antibody revealed mainly monocytes and neutrophils (Supplementary Fig. 2a) and that anti-Gr1 injection induced a drastic and specific depletion in granulocyte, and especially neutrophils (Ly6G⁺) population in the scAT *in vivo* from 24 to at least 72 h after injection (Supplementary Fig. 2b, c). ScAT resection was thus performed 24 h after anti-Gr1 injection. ROS production quantified 6 h post-resection was significantly decreased in the injured scAT after anti-Gr1 treatment (Fig. 2d, e), and return to basal values (dotted line). This significant decrease in ROS production was associated with inhibition of regeneration quantified 4 weeks post-resection (Fig. 2f). Indeed, the weight ratio between resected and contralateral scAT returned to values observed in scar healing conditions (Fig. 2g). These data demonstrate for the first time that the ROS required for regeneration are produced by granulocytes. In addition, ROS production was quantified *in vivo* by using luminol that enables bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity²³ suggesting that ROS production post-resection depends mainly on neutrophils.

In parallel, ROS production was quantified *in vitro* in scAT-Gr1⁺ and Gr1⁻ cells sorted 6 h post-resection, from mice previously treated or not with NaIM. In contrast to scAT-Gr1⁻ cells (data not shown), scAT-Gr1⁺ cells were able to produce ROS (Fig. 2h). In addition, when sorted from NaIM-treated mice, scAT-Gr1⁺ cells exhibited a significantly higher ROS production than scAT-Gr1⁺ cells sorted from NaCl-treated mice (Fig. 2h) thus confirming the results obtained *in vivo*. NaIM being an antagonist of μ opioid receptors, mice knock out for the μ opioid receptor (μ KO mice), and therefore unable to respond to endogenous opioids through activation of this receptor subtype, were subjected to scAT resection before Gr1⁺ cell sorting from resection plane 6 h post-resection. ROS production was significantly higher in scAT-Gr1⁺ cells sorted from μ KO mice compared to NaCl-treated mice but remained slightly lower than the production quantified in scAT-Gr1⁺ cells sorted from NaIM treated mice (Fig. 2h). In order to confirm the involvement of μ receptors in the NaIM effect, Gr1⁺ cells were treated with DAMGO, a selective μ opioid receptor agonist, that reverses the inhibitory effect of NaIM. In this condition, the ROS production by Gr1⁺ cells sorted from NaIM



mice was inhibited (Supplementary Fig. 2d) suggesting again a direct effect of opioids on granulocytes through μ opioid receptors. Interestingly, this high ROS production is associated with a spontaneous scAT-regeneration after resection in μ KO mice (Fig. 2i), the weight ratio between resected and contralateral scAT

being similar in μ KO and NaIM-treated mice and significantly higher than in NaCl-treated mice (Fig. 2j). Altogether, these results demonstrate that through a direct effect on μ opioid receptors, NaIM-induced ROS production by granulocytes determines tissue repair outcome.

Fig. 1 Regenerative healing is characterized by early and transient inflammation. **a** Representative pictures of scAT 1 month post-resection and NaCl (scar healing condition) or NaIM (regenerative condition) treatment (scale bar: 0.5 cm). **b** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in NaCl or NaIM-treated mice ($n = 12\text{--}15$ per group). **c** Representative pictures of resection plane area in NaCl and NaIM treated mice one month post-resection. Adipocytes (yellow) were stained with Bodipy and vessels (red) with in vivo Lectin injection. Collagen fibers (gray) were imaged using a second harmonic generation (SHG) signal. Images were obtained using maximum intensity projections of 23 stack images. (scale bar: 50 μm). **d, e** Quantification by RTqPCR at 2 h, 6 h, and 12 h post-resection of mRNA encoding cytokines (Interleukin 1 β , 6 (*Il1 β* , *Il6*), Tumor Necrosis Factor α (*Tnfa*), Transforming Growth Factor β (*Tgfb*) and interleukin 10 (*Il10*)) (**d**) and enzymes involved in lipid mediator synthesis (Cyclooxygenase 2 (*cox2*), Prostaglandin E2 synthase (*Pge2 synthase*), Prostaglandin D2 synthase (*Pgd2 synthase*), Arachidonate 5-lipoxygenase (*Alox5*) and Leukotriene A4 Hydrolase (*Lta4h*)) (**e**) in SVF isolated from the injured scAT of NaCl or NaIM treated mice, 6 and 12 h post-resection. Results are expressed as a ratio between PGD₂ and PGE₂ metabolites ($n = 5\text{--}7$ per group). **g** Heatmap performed on 14 standardized gene expressions, 6 h post-resection. The dendrogram performed according to the Ward method was able to cluster between scar and regenerative healing conditions. Principal component analysis performed at 2 h (**h**) 6 h (**i**) and 12 h (**j**) post-resection on standardized gene expression. Individuals with scar healing and regenerative healing signatures were colored in red and green, respectively. Data are represented as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between scar and regenerative healing conditions). NaIM naloxone methiodide, scAT subcutaneous adipose tissue, SVF stromal vascular fraction, wt weight.

Efficient efferocytosis of neutrophils by CD11c⁺ macrophages is required for regeneration

One of the mechanisms by which granulocytes (neutrophils and monocytes) are involved in tissue repair is their transition to apoptosis followed by their clearance by macrophages (efferocytosis)¹⁰. We thus focused on the resolution phase of inflammation following scAT resection with or without NaIM treatment, and performed a time-course study of the inflammatory cell populations during 72 h following resection, focusing on neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺), monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁺/Ly6G⁻) and macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺/Ly6G⁻) following the gating strategy shown in Supplementary Fig. 1b. The resection led to an early peak (6 h) of neutrophils followed by a rapid return to basal values in the resection plane in regenerative condition, whereas the increase in neutrophils number was delayed (24 h) and persisted for 72 h post-resection in scar healing condition (Fig. 3a). The monocyte number remained low in regenerative conditions while it increased in scar healing mice 24 h post-resection and returned to basal values thereafter (Fig. 3b). The total macrophage number increased following resection, with a maximum observed at 24 h, then reaching a plateau, and no significant differences were observed between the two conditions (Fig. 3c). Most of the macrophages in the resection plane 24 h post-resection were producing IL-6 (Fig. 3d, e), and a smaller proportion was producing TNF α and IL-10 (Fig. 3d, e). The percentage of IL-6-producing macrophages was significantly lower in regenerative than in scar healing conditions, while the opposite was observed for TNF α -producing macrophages (Fig. 3e). Macrophage efferocytosis capacity was then assessed in vivo in regenerative or scar healing conditions. To this end, isolated and CMTMR-labeled neutrophils were injected in vivo 3 h before resection. Neutrophil viability was evaluated by annexin V staining. All CMTMR⁺ neutrophils were alive before injection, while most of them were apoptotic (Annexin V⁺) at the time of efferocytosis analysis (Supplementary Fig. 3a). Macrophages having or not engulfed neutrophils were then visualized (Fig. 3f) and quantified in the resection plane 17 h post-resection, a time-point corresponding to the progressive decrease in neutrophil number in regenerative conditions (Fig. 3a). The percentage of efferocytic macrophages was significantly higher in regenerative than in scar healing conditions (Fig. 3g). To test whether efficient efferocytosis was required for regeneration, inhibition of efferocytosis was performed in regenerative conditions by using an anti-TIM4 blocking antibody that disrupts the interaction between apoptotic cells and macrophages²⁴. Isotype was used as a control. Treatment with anti-TIM4 antibody in regenerative conditions induced a drastic decrease in the percentage of efferocytic macrophages that returned to basal values (Fig. 3g), suggesting that efferocytosis was mainly

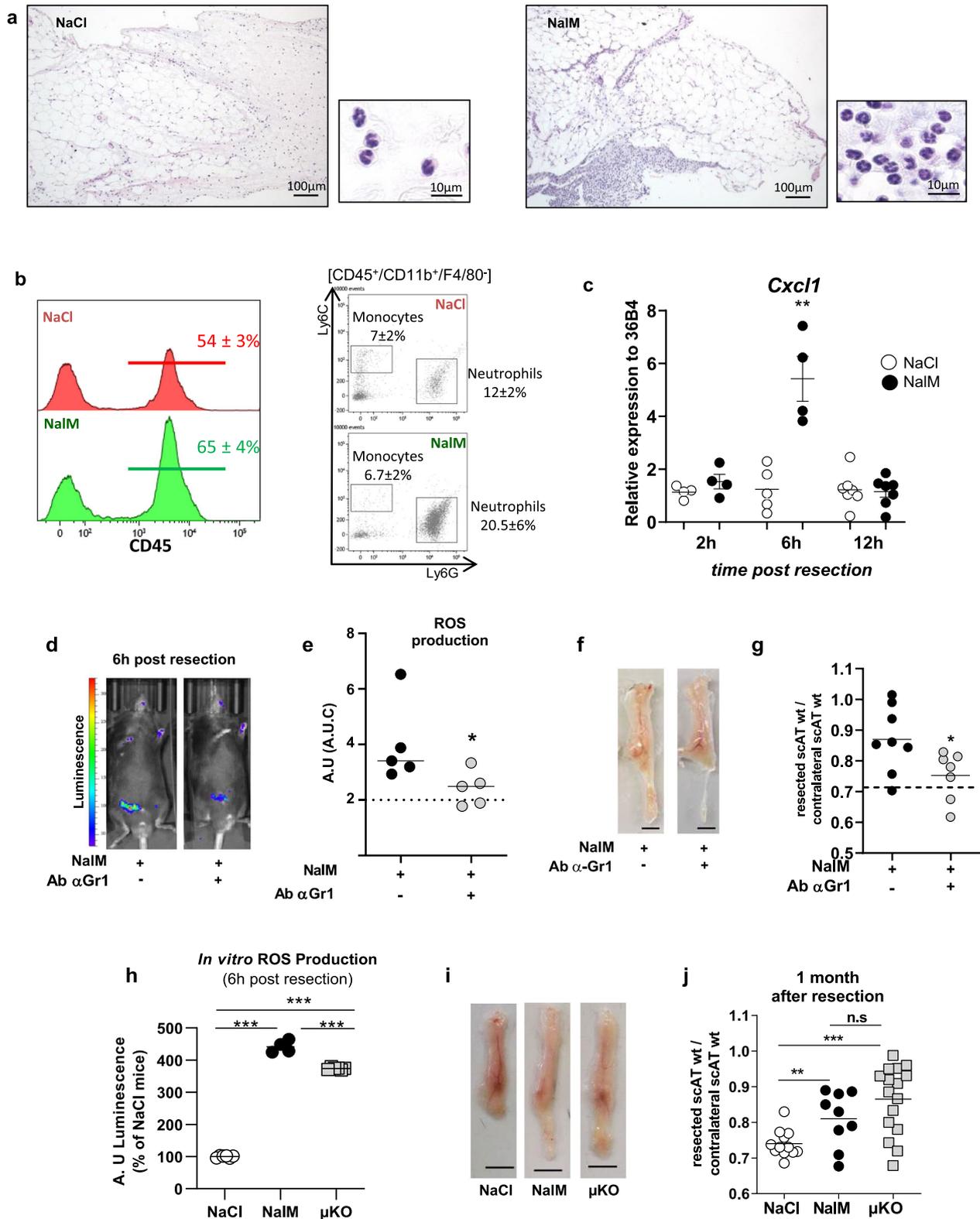
mediated through TIM4 receptor in these conditions. This disruption of TIM4-mediated efferocytosis prevented NaIM-induced regenerative healing, as demonstrated by both macroscopic observations (Fig. 3h) and scAT weight ratio that returned to values obtained in scar healing (NaCl) conditions (Fig. 3i). We also investigated the expression of CD36, another major receptor involved in efferocytosis. Neither the percentage of macrophages expressing CD36 nor the expression of CD36 in sorted macrophages differed between scar and regenerative healing conditions, 24 h post-resection (Supplementary Fig. 3b–d), suggesting that this receptor was not involved in the differential efferocytic activity. Altogether, these data demonstrate for the first time that an efficient TIM4-mediated efferocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages is a crucial mechanism required for tissue regeneration.

Knowing that macrophages are a heterogeneous population differentially involved in the acute inflammatory phase of tissue repair, we then quantified both pro- and anti-inflammatory macrophages, based on the expression of CD11c and CD206 respectively. The number of pro-inflammatory (CD11c⁺) macrophages substantially increased (5 \times) to reach a maximum of 24 h post-resection (Fig. 3j). In contrast, the number of anti-inflammatory (CD206⁺) macrophages slightly increased (2 \times) from 6 to 72 h following resection (Fig. 3k). No significant difference was observed between healing and regenerative conditions.

To uncover the role of CD11c⁺ macrophages in tissue repair, we used CD11c-DTR mice, in which, CD11c⁺ cells can selectively be depleted by injection of diphtheria toxin (DT) as previously described²⁵. We first confirmed that in the scAT, most of the CD11c⁺ cells expressed the macrophage markers F4/80 and CD11b (Supplementary Fig. 4a). The toxin was injected 24 h before surgery, and regeneration was analyzed 4 weeks later. As controls, we used CD11c-DTR⁻ mice injected with DT. As expected, DT treatment efficiently decreased the number of CD11c⁺ macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺) present in the resection plane 24 h post-resection (Supplementary Fig. 4b). It resulted in a significant accumulation of neutrophils (Fig. 3l, m), suggesting an altered efferocytosis. Depletion of CD11c⁺ macrophages also prevented NaIM-induced tissue regeneration (Fig. 3n), and decreased the weight ratio between resected and contralateral scAT to values obtained in scar healing (NaCl) condition (Fig. 3o). These data underlined the crucial role of CD11c⁺ macrophages in the handling of tissue repair.

AT resident macrophages but not classical BM-derived macrophages are required for tissue regeneration

We previously demonstrated that scAT myeloid populations mainly originate from AT hematopoiesis rather than BM



hematopoiesis in physiological conditions²⁰. We thus investigated the origin of the macrophages involved in regeneration. Chimeric mice were generated by using standard repopulation assays as previously described²⁰ by injecting 2×10^3 scAT-LSK or BM-LSK sorted from tdTomato mice mixed with 2×10^5 BM cells isolated

from C57Bl/6 mice (Fig. 4a). Injection of BM cells ensured the survival of the recipient, as previously described²⁶. Chimeric mice were then subjected to scAT resection 6 weeks after transplantation once the reconstitution was complete. The total chimerism and the origin of macrophages were determined by flow

Fig. 2 Neutrophils depletion impairs ROS production and inhibits scAT regeneration in NalM-treated mice. **a** Representative comparative microscopic aspects of the resection plane of scAT 8 h post-surgery in NaCl and NalM-treated mice (Hemalun & eosin staining). **b** Representative histograms and dot plot analyses of SVF cells isolated from NaCl (red curve) or NalM (green curve) treated mice 6 h post-resection, showing the percentage of CD45⁺ cells and granulocytes (neutrophils: CD45⁺/Ly6G⁺/Ly6C⁻/CD11b⁺ and monocytes CD45⁺/Ly6G⁻/Ly6C⁺/CD11b⁺) in the resection plane. **c** Gene expression quantification by RT-qPCR of the chemokine *Cxcl1* in SVF isolated from the resection plane of NaCl-treated or NalM-treated mice 2, 6, and 12 h post-resection ($n = 4$ per group). **d** Representative in vivo imaging of ROS production 6 h post-resection in NalM-treated mice, treated or not with anti-Gr1 blocking antibody (Ab α -Gr1). **e** Quantification of ROS production in vivo from 0 to 72 h post-resection in NalM-treated mice, treated or not with Ab α -Gr1. The dotted lines represent ROS production obtained in NaCl-treated mice ($n = 5$ per group). **f** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in NalM-treated mice treated or not with Ab α -Gr1 (scale bar: 0.5 cm). **g** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in NalM treated mice, treated with isotype or Ab α -Gr1 ($n = 7-8$ per group). The dotted line show values obtained in scar healing (NaCl) conditions. **h** In vitro quantification of ROS production by Gr1⁺ populations sorted from scAT of NaCl, NalM, or μ KO mice 6 h post-resection ($n = 4-6$ per group). **i** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in NaCl or NalM-treated mice and in NaCl-treated mice knock out for the μ opioid receptor (μ KO) (scale bar: 0.5 cm). **j** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in NaCl, NalM-treated and μ KO mice ($n = 9-16$ per group). Data are represented as mean \pm SEM (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ between scar and regenerative healing conditions). AT adipose tissue, AU arbitrary units, AUC area under the curve, NalM naloxone methiodide, scAT subcutaneous adipose tissue, SVF stromal vascular fraction, ROS reactive oxygen species, wt weight.

cytometry 24 h post-resection. Total chimerism in the AT of chimeric mice reached 50–70%, and all the macrophages present in the resection plane derived from the BM in BM-chimeric mice or from the scAT in AT-chimeric mice (Fig. 4b).

In order to compare BM and scAT-macrophage function, efferocytosis was assessed by in vivo-specific assays. Interestingly, flow cytometry analysis demonstrated a significant increase in phagocytic macrophages in the resection plane 24 h post-resection in AT- compared to BM-chimeric mice in regenerative conditions (Fig. 4c, d) associated with a significant decrease in neutrophil number (Fig. 4e) (for gating strategy, see Supplementary Fig 1b). On the contrary, in BM-chimeric mice, there was no difference in the percentage of phagocytosing macrophages in vivo or in neutrophil numbers between scar and regenerative healing conditions (Fig. 4c–e). Then, to demonstrate that these differences in efferocytosis capacity drive tissue repair outcomes towards regeneration or scar healing, regeneration was assessed 4 weeks later. Macroscopic observations showed that AT-chimeric mice were able to regenerate but not BM-chimeric mice that instead displayed scar healing (Fig. 4f). In addition, we observed a significant difference in the weight ratio between resected and contralateral scAT in NalM versus NaCl treated AT-chimeric mice, while no difference was observed in BM-chimeric mice (Fig. 4g). Histological analyses of resection planes performed in NalM-treated chimeric mice revealed large unilocular fully differentiated adipocytes in AT-mice, as well as organized vascularization (Fig. 4h). In contrast resection plane in BM-mice was characterized by scattered adipocytes with small lipid droplets embedded in collagen deposition (Fig. 4h). These results suggest that macrophages play distinct role in healing process according to their origin. Altogether, these results show that macrophages originating from both the BM and the AT contribute to scar healing. However, in contrast to BM macrophages, scAT macrophages are the only ones able to exhibit efficient efferocytosis and rapid clearance of neutrophils and thus to drive tissue regeneration.

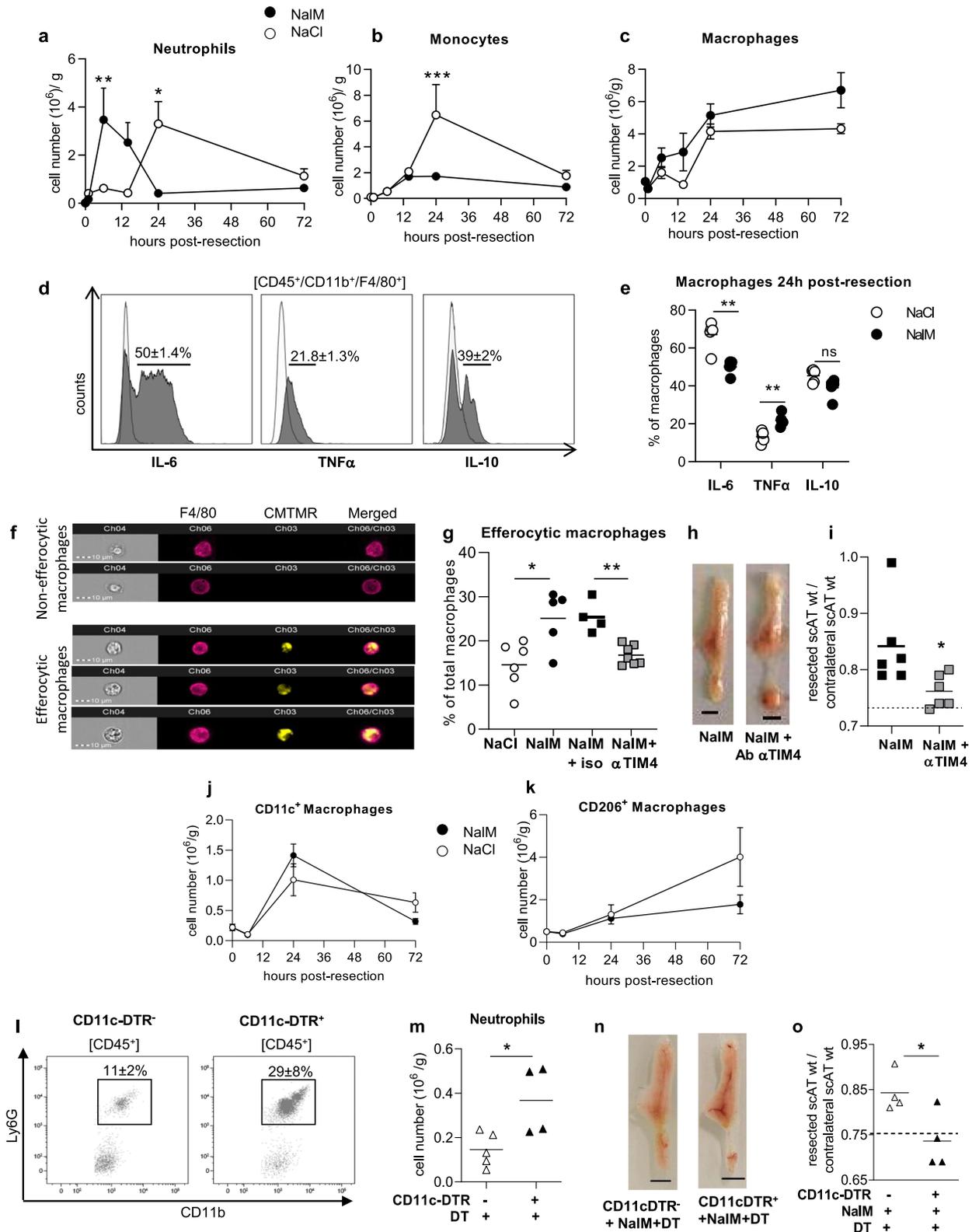
DISCUSSION

In this study, we compared the early cellular mechanisms driving tissue healing or regeneration in adult mammals. By using a newly developed model of tissue regeneration in a commonly used strain of mice⁴, we demonstrated that a transient and early peak of neutrophils and their ROS production, as well as their rapid elimination by resident macrophages through an efficient efferocytosis, are required for regeneration in adult mice.

Tissue injury classically leads to an early pro-inflammatory step, characterized by the production of pro-inflammatory mediators²⁷. Here, the increase in the expression of pro-inflammatory cytokines in regenerative conditions shortly after scAT resection is consistent

with the role of self-limiting acute inflammation in proper restorative response. Indeed, only a few studies highlight the crucial role of intense and transient production of pro-inflammatory cytokines to allow correct tissue repair^{28,29}. As an example, the inhibition of IL-1 β and TNF α expression by glucocorticoids leads to healing defects, and this study suggests that early induction of these genes is one of the important mechanisms in this process²⁸. Among the first cytokines involved in this tissue repair, IL-6 and TNF α have been shown to promote different tissue regeneration in mammals and zebrafish^{30,31}. In addition, the early and transient upregulation of IL-10 and TGF β observed in regenerative conditions are in line with the anti-inflammatory/pro-repair activities of these cytokines¹⁶. Among the other signaling molecules released during inflammation are the prostaglandins. PGE2 and D2 are indeed produced in a time-dependent fashion, and actively contribute to tissue repair^{32,33}. In agreement with our data, the inhibition of the PGE2-degrading enzyme, thus leading to an increase in PGE2 levels, has been shown to promote tissue repair in a mouse model of liver injury³⁴. When analyzed together through PCA, our results show that the global gene expression discriminates between regenerative and scar healing conditions, but only very early after tissue lesion, suggesting that temporal cues are critical for the tissue repair outcome. This is in agreement with previous work showing that cytokines such as IL-6 are protective and limit host damage in the short term, but can also be deleterious when chronically elevated³⁵. It has to be noted however, that unlike our work, most of the studies on tissue regeneration do not focus on the earliest steps of tissue repair.

The early pro-inflammatory stage following tissue injury is dominated by innate immune cells such as neutrophils and macrophages. The accumulation of granulocytes and especially neutrophils immediately after tissue damage has been largely documented³⁶, and is supported by the upregulation of Cxcl1, a chemokine that contributes to attract neutrophils on the lesion site²². Neutrophils have been described as critical players in injury and repair although, it was unclear whether they have beneficial or detrimental healing functions³⁷. In addition, ROS production was shown to either directly induce tissue damages⁵ or to be involved in regeneration process in diverse species including mammalian ones^{4,38}. Here, our data clearly identify granulocytes as responsible for ROS production required for regeneration in mammals. Moreover, we demonstrated that through a direct effect on μ opioid receptor, NalM, an antagonist of this receptor induces the production of ROS by granulocytes. The μ opioid receptor has already been described on granulocytes, and in agreement with our results, it is suggested that its activation inhibits the inflammatory response³⁹.



Our results highlight the involvement of macrophages in regeneration. This is in agreement with previous studies performed in different vertebrates among which *Acomys* or newborn mice and showing that macrophage depletion inhibits regeneration^{8,9,40–42}. A bilateral link between ROS and

macrophage efferocytosis has been recently proposed. Indeed, ingestion of apoptotic neutrophils by macrophages activates ROS production that in turn facilitates efferosome maturation and neutrophil degradation⁴³. However, how macrophages initiate this pro-regenerative response remains unclear. Gain and loss of

Fig. 3 Efficient efferocytosis of apoptotic neutrophils by CD11c⁺ macrophages is required for regeneration. Time-course study of the number of neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺) (a), monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁺/Ly6G⁻) (b) and macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺/Ly6G⁻) (c) in the scAT of NaCl and NaIM treated mice ($n = 5-13$ per group). **d** Representative histogram of flow cytometry of IL-6, TNF α , and IL-10 staining (gray histogram) or isotype (white histogram) on macrophages in resection planes 24 h post-resection. **e** Percentage of IL-6, TNF α , and IL-10 producing macrophages in NaCl or NaIM treated mice 24 h post-resection ($n = 5$ per group). **f** Examples of the imaging flow cytometry channels of macrophages stained with F4/80 (pink) and having engulfed (lower panels) or not (upper panels) CMTMR stained apoptotic neutrophils (yellow) in scAT of NaCl-treated mice 17 h post-resection. **g** Quantification of efferocytic macrophages in the scAT of NaCl and NaIM-treated mice with isotype or TIM4 blocking antibody ($n = 4-7$ per group). **h** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in mice treated with NaIM and with or without blocking TIM4 antibody (scale bar: 0.5 cm). **i** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in mice treated with NaIM and with or without blocking TIM4 antibody ($n = 6$). The dotted line shows values obtained in scar healing (NaCl) conditions. Quantification of macrophages CD11c⁺ (j) and CD206⁺ (k) in NaCl and NaIM-treated mice 24 h post-resection, ($n = 5$ per group). **l** Representative dot plots of flow cytometry analyses showing neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺) 24 h post-resection in scAT of CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and diphtheria toxin (DT). **m** Quantification of neutrophils 24 h post-resection in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with DT and NaIM ($n = 4-5$ per group). **n** Representative pictures of scAT 1 month post-resection in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and DT (scale bar: 0.5 cm). **o** Weight ratio between resected and contralateral scAT in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and DT ($n = 4$). The dotted line shows values obtained in scar healing (NaCl) conditions. Data are represented as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ between scar and regenerative healing conditions). Ab Antibody, NaIM naloxone methiodide, CMTMR 5-(and-6)-((4-chloromethyl)benzoyl)amino tetramethylrhodamine, scAT subcutaneous adipose tissue, wt weight.

efferocytic function have shown that the timely clearance of apoptotic cells is required to induce healing in various mammal tissues^{40,44,45}. Indeed, the prolonged presence of neutrophils in the wound triggers additional production of inflammatory mediators and is deleterious for proper tissue repair⁴⁶. Here, we propose that this mechanism is required for regeneration. In addition, efferocytosis is mediated through TIM4, a receptor shown to be expressed in various resident macrophages including peritoneal macrophages, and required for their efferocytic activity⁴⁷. Moreover, by using CD11c⁺ cell depletion, we identified CD11c⁺ macrophages as crucial actors in this context. It has to be noted that this strategy depletes the whole CD11c⁺ population. Although it mostly contains macrophages in these conditions, the involvement of other cell types such as dendritic cells cannot be totally excluded. In the AT, CD11c⁺ macrophages have been identified as pro-inflammatory and involved in the clearance of senescent cells^{48,49}. The expression of CD11c has also been associated with both tissue resident macrophages that play a central role in non-inflammatory apoptotic cells clearance required for the maintenance of tissue homeostasis^{50,51} and monocyte-derived macrophages involved in tissue repair⁵².

Finally, one of our most striking results reveals that AT-resident macrophages derived from AT-endogenous hematopoiesis, but not BM-derived macrophages, are necessary for enabling regeneration. Indeed, using chimeric mice, we demonstrated that pro-regenerative efferocytotic macrophages originated from AT. This result emphasizes the beneficial role of myeloid cells deriving from endogenous AT hematopoiesis in tissue repair in contrast to medullar-originating cells, as already proposed in the context of cardiac remodeling after infarction⁵³. In addition, these data are in line with the concept that the contribution of macrophages to tissue regeneration following injury depends on their lineage and/or developmental origin. Indeed, evidences in liver suggest that monocyte-derived macrophages can accelerate fibrosis resolution⁵⁴ while a more recent study showed that resident dermal macrophages contribute to axon regeneration after nerve injury⁵⁵. In the heart, resident macrophages derived from the primitive yolk sac and fetal progenitors are involved in tissue remodeling and cardiac regeneration while macrophages originating from definitive hematopoietic progenitors participate in the initiation of inflammation^{56,57}.

Altogether, our findings indicate that early and transient recruitment of granulocytes producing ROS concomitant with an early inflammation is required for tissue regeneration in adult mice. We also elucidated the main role of CD11c⁺ resident macrophages in the clearance of neutrophils to promote regeneration. This work highlights a cellular pathway able to

drive tissue repair towards regeneration in adult mammals and highlights potential targets that could be manipulated to induce regeneration in the context of tissue injury. Further studies characterizing the intrinsic phenotype of pro-resolutive resident macrophages will advance our understanding of their precise roles in driving tissue repair towards regeneration rather than scar formation.

METHODS

Animals

Experiments were performed on 5–7 weeks-old male C57BL/6 mice (Envigo) and congenic male B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato-EGFP)^{Luo}/J} (also known as mTmG mice; (Jackson Laboratories, stock No. 007676). Animals were group-housed in a controlled environment (12-h light/dark cycles at 21 °C) with unrestricted access to water and a standard chow diet in a pathogen-free animal facility. Granulocytes depletion was achieved by i.p. injection of 200 μ g of anti-mouse Gr-1 blocking antibody (clone RB6-8C5, BioXCell, West Lebanon, NH, USA) 24 h before surgical AT resection. For CD11c⁺ cell depletion, transgenic CD11c-DTR mice were injected i.p. with 20 ng/kg of diphtheria toxin the day before tissue resection as previously described²¹.

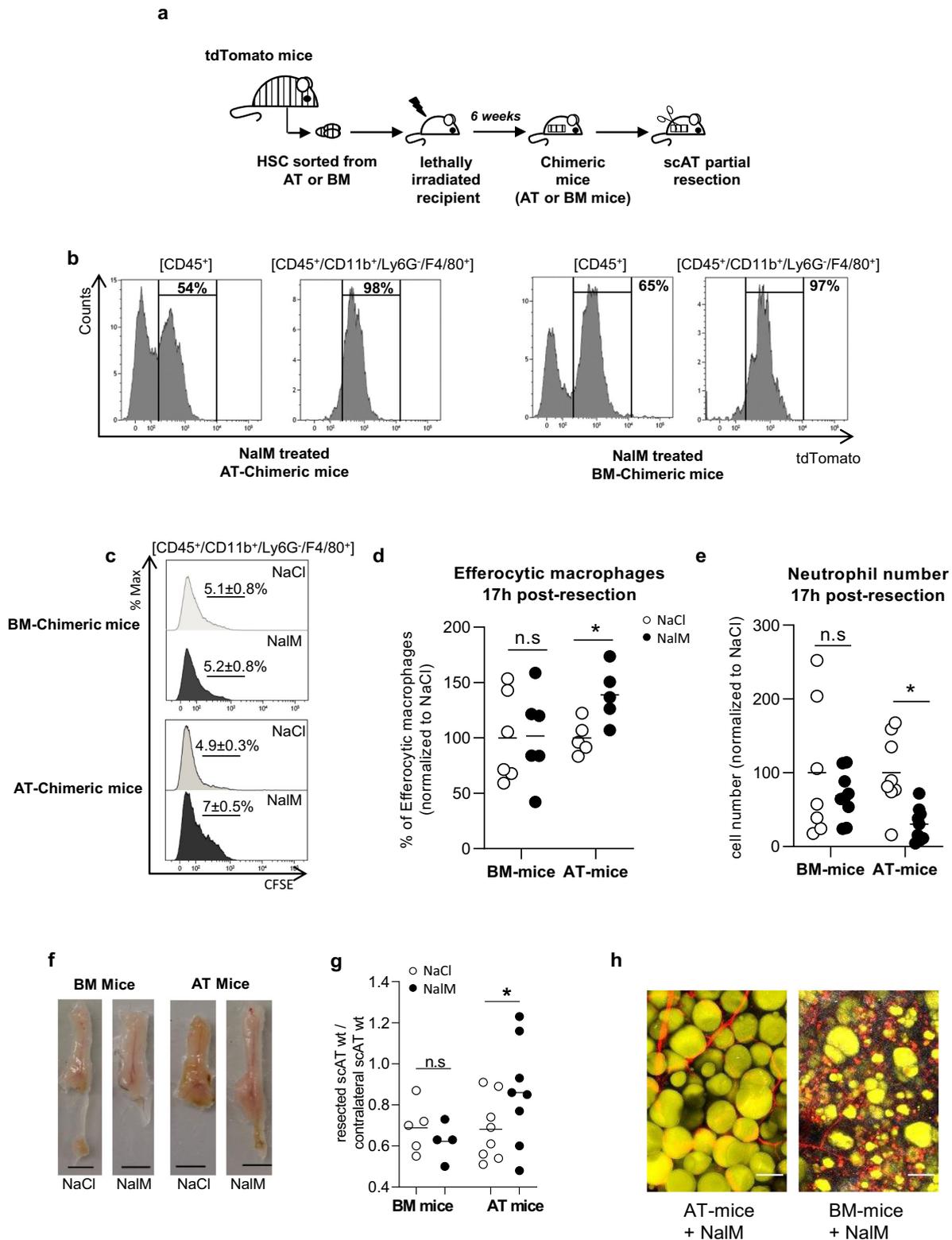
Before tissue removal, mice were killed by cervical dislocation. All experiments were carried out in compliance with European Community Guidelines (2010/63/UE) and approved by the institutional ethics committee and from the Ministry of National Education, Higher Education and Research (protocol reference: 10691-201802091153445-v1).

Sub-cutaneous AT (scAT) resection

Animals were anesthetized by inhalation of isoflurane (2.5%) and subjected to a single incision on the abdomen to access and resect 35–40% of the right scAT between lymph node and groin. The skin was then closed with three suture points. Mice were then injected subcutaneously at the surgery site, once a day from d0 to d3 post-resection with NaIM (17 mg/kg, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) or NaCl 0.9% to induce, respectively, regenerative or scar healing, as previously described⁴. ScAT regeneration was assessed by morphological observations and calculating the weight ratio between the right (resected) and the left (contralateral) fat pads.

In vivo ROS imaging

Mice were briefly anesthetized by inhalation of isoflurane (2.5%) and injected i.p. with 5 mg of luminol (5-amnio-2,3-dihydro-1,4-Phtalazinedione, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). In vivo bioluminescence was imaged using an IVIS Spectrum 200 (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA) during 2 min exposure at different times after luminol injection. Image analyses were performed using Living Image 3.0 Software (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA). The color intensity of the pictures was calibrated from 30 (min) to 330 (max). For each animal, the sham surgery area signal was subtracted to a resected area photon flux.



Isolation of BM and adipose-derived stromal vascular cell fraction (SVF)

At necropsy, BM cells were immediately flushed from the sampled femur with α -MEM medium (Life Technologies). Resection planes were carefully dissected, mechanically dissociated, and digested at 37 °C with collagenase

(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 30 min. Cells from the scAT SVF were collected by centrifugation after elimination of undigested fragments by filtration as previously described²⁰. Red blood cells were removed by incubation in hemolysis buffer (140 mM NH_4Cl and 20 mM Tris, pH 7.6). Cells were then counted and used for flow cytometry, cell sorting in vitro ROS quantification, or Real-Time PCR.

Fig. 4 AT Resident macrophages but not classical BM-derived macrophages are required for tissue regeneration. **a** Hematopoietic chimera strategy: 2×10^3 LSK cells sorted from the scAT or the bone marrow (BM) of mTmG mice were co-injected with 2×10^5 total BM cells of C57Bl6 into lethally irradiated C57Bl6 recipients. Two months after hematopoietic reconstitution, scAT resection was performed and chimeric mice were treated with NaCl or NaIM. **b** Representative histograms showing chimerism (tdTomato staining) in total immune cells (CD45⁺) and macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/Ly6G⁺/F4/80⁺) in NaIM-treated AT- and BM-chimeric mice, 24 h post-resection. **c** Representative histograms of CFSE staining in macrophages 24 h post-resection in NaCl and NaIM-treated chimeric mice, corresponding to the percentage of macrophages having engulfed CFSE⁺ neutrophils. **d** Quantification of efferocytic macrophages 24 h post-resection in NaCl and NaIM-treated chimeric mice ($n = 5-6$). **e** Quantification of neutrophil number by flow cytometry 24 h post-resection, in NaCl or NaIM, treated mice ($n = 7-8$ per group). **f** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in BM- and AT-chimeric mice treated or not with NaIM (scale bar: 0.5 cm). **g** Weight ratio between resected and contralateral scAT in AT- and BM-chimeric mice 1-month post-resection ($n = 5-8$ per group). **h** Representative pictures of resection plane area of NaIM-treated AT- and BM- chimeric mice, one-month post resection. Adipocytes (yellow) were stained with Bodipy and vessels (red) with in vivo Lectin injection. Collagen fibers (gray) were imaged using second harmonic generation (SHG) signal. Images were obtained using maximum intensity projections of 23 stack images (scale bar: 50 μ m). Data are represented as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ between scar and regenerative healing conditions). AT adipose tissue, BM bone marrow, LSK Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ cells, NaIM naloxone methiodide, scAT subcutaneous adipose tissue, wt weight.

Competitive repopulation assays

Competitive repopulation assays were conducted as described previously²⁰. Briefly, 2×10^3 Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ (LSK) cells sorted from the scAT or the BM of donor mice were mixed with 2×10^5 competitors BM total cells from C57Bl/6 mice. Donor mice were mT/mG mice expressing Tomato ubiquitously. In all the experiments, control and experimental LSK cells were sorted from animals of equal age. LSK purity was determined by flow cytometry and was between 92% and 97%. The mixed population was injected i.v. into lethally irradiated (10 Gy, ¹³⁷Cs source) recipient mice of equal age. Mice reconstituted with AT- or BM-LSK (AT-mice or BM-mice) were then allowed to recover for 6 weeks. Chimerism was assessed by quantifying Tomato⁺ (dT⁺) cells among total CD45⁺ cells in the SVF.

RNA extraction and real-time PCR

Total RNA was isolated from SVF by RLT:ethanol 100% extraction and purified using a Microprep kit (Zymo). 250 ng of total RNA was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies/Applied Biosystem), SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystem), and 300 nmol/L primers (Supplementary Table 1) on an Applied Biosystem StepOne instrument. All relative gene expression was determined using the $\Delta\Delta$ CT method and normalized to the 36B4 level.

ELISA cytokines titration

At necropsy, exudates were collected at the resection plane 6 and 12 h post-resection (400 μ L). The release of PGD2 and PGE2 was determined with a commercially available OptiEIA kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry analysis and cell sorting

Freshly isolated SVF cells were stained in PBS containing FcR-blocking reagent for 30 min on ice with fluorochrome-conjugated antibodies. Phenotyping was performed by immunostaining with conjugated rat anti-mouse Abs and compared with isotype-matched control Abs (Supplementary Table 2). Cell apoptosis was assessed by AnnexinV (eBioscience) and DAPI staining according to the manufacturer's instructions. Cells were then analyzed on an LSR Fortessa flow cytometer (BD Biosciences). Data acquisition and analysis were performed using Diva (Becton Dickinson) and Kalusa version 1.2 (Beckman Coulter) software, respectively, following gating strategies indicated in Supplementary Fig 1.

For LSK cell-sorting experiments, SVF cells were stained with Ly-6A/E (Sca-1), CD117 (c-Kit) antibodies, and Lineage Panel (Lin). Cells negative for lineage markers were gated, and Sca-1 and CD117 double-positive cells were sorted (BD FACSAria Fusion III Cell sorter, BD Biosciences). Enrichment of the LSK was determined by flow cytometry and varied between 92% and 97%. A similar strategy was used to sort macrophages on the basis of CD45, CD11b, and F4/80 expression (Supplementary Table 2).

In vivo efferocytosis assay

Neutrophils from C57Bl/6 mice were isolated from the BM using a neutrophil isolation kit according to the manufacturer's instructions (Miltenyi). Neutrophils were then stained with 2.5 μ M of CellTrace carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probe) or 5 μ M of

chloromethyl-benzoyl-aminotetramethyl-rhodamine (CMTMR; Molecular Probe). Three hours before scAT resection, 3×10^6 neutrophils were injected i.v. into wild-type, AT- or BM-chimeric mice. The resection plane was removed 17 h after resection and the proportion of macrophages CFSE⁺ or CMTMR⁺ was visualized and quantified by Image flow cytometry and flow cytometry, respectively, as described previously²⁸.

Efferocytosis inhibition was achieved by three successive i.v. injections of anti-mouse TIM4 blocking antibody (TIM4 Ab; 0.5 mg/mice/injection) (BioXCell, West Lebanon, NH, USA) or its isotype control (rat IgG2b clone LTF-2, BioXCell) 12 h before and 3 and 17 h after surgery.

Image flow cytometry

Individual cell images were acquired using IDEAS software (Amnis Merck Millipore, Billerica, MA, USA) on a 3-laser 6-channel imaging flow cytometer (Image Stream X Mark II, Amnis Merck Millipore) with $\times 40$ magnification. For each data file, at least 50,000 single cells were acquired—debris and doublets were excluded based on their area and aspect ratio. Single-stain controls were acquired (all channels on, no brightfield and no side scatter image), a compensation matrix was calculated and then applied to the data files using IDEAS software (Amnis Merck Millipore). Briefly, focus cells were identified using the gradient RMS feature of the brightfield channel (Ch04). Single cells were then identified from debris and cell clusters using a plot of aspect ratio vs. area of the brightfield channel. Finally, we analyzed single cells with plot based on the intensity of CMTMR and F4/80 staining (Ch03 and CH06, respectively).

Histological evaluation

3 h after surgical resection, resection planes were sampled at necropsy, fixed in 10% neutral buffered formalin and paraffin-embedded. Three μ -thick paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin and microscopically evaluated by a pathologist.

Biphoton microscopy

The mice were injected in vivo with retro-orbital TRITC- Griffonia simplicifolia Lectin (Eurobio) to achieve proper vessel labeling. At 30 min after in vivo lectin injection, animals were euthanized and scAT was removed, oriented, and fixed overnight. scAT was embedded in 2% agarose gel and cut into 300 μ m slices, then incubated in Bodipy in PBS/0.2% triton 1 h at room temperature. Imaging was performed using a Biphotonic Laser Scanning microscope (LSM880—Carl Zeiss, Jena, Germany) with an objective lens LCI'Plan Apochromat' $\times 10/0.45$ and excited using 488 nm (bodipy), 561 nm (lectin), and 840 nm (SHG) lasers. Images obtained were treated with Fiji Software.

In vitro ROS quantification

The oxygen-dependent respiratory production was measured by chemiluminescence in the presence of luminol (66 μ M, Sigma-Aldrich) using a thermostatically monitored luminometer (37 $^{\circ}$ C) (210410A EnVision Multi-label Reader) on 14×10^4 Gr1⁻ or Gr1⁺ cells sorted from SVF. DAMGO ([D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-Enkephalin acetate salt, Sigma Aldrich) was added 5 min before luminescence measure. The luminol detects both reactive oxygen and nitrogen intermediates (O₂⁻, ONOO⁻, OH[•]). Chemiluminescence was continuously monitored for 1 h. The ROS level

was quantified and compared between different conditions using the area under the curve.

Statistical analyses

Experiments done previously were used to determine animal sample size with adequate statistical power. The number of animals used in each study is indicated in the figure legends. Mice were randomized allocated to the different groups and investigators were blinded to analyses. All results are given as means \pm SEM. Normality was checked using the D'Agostino and Pearson omnibus normality test, and variance between groups was compared. Statistical differences were measured using an unpaired two-sided Student's *t*-test, or a nonparametric test (Mann–Whitney) when data did not pass the normality test, or when variances between groups were different. Data were analyzed using an ANOVA test when there were more than two groups. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 9.0 software and a two-tailed *p* value with a 95% confidence interval was acquired. *p* < 0.05 was considered as significant. The following symbols for statistical significance were used throughout the manuscript: **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001.

For gene expression at 6 and 12 h, a principal component analysis (PCA) was also performed as an unsupervised dimension reduction method. R software 3.6.3 with the “factoextra” 1.0.6 and “FactoMineR” 2.3 packages were used.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 4 August 2020; Accepted: 7 July 2021;

Published online: 03 August 2021

REFERENCES

- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).
- Seifert, A. W. et al. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature* **489**, 561–565 (2012).
- Deng, Z. et al. Characterization of articular homeostasis and the mechanism of superior cartilage regeneration of MRL/Mpj mice. *FASEB J.* **33**, 8809–8821 (2019).
- Labit, E. et al. Opioids prevent regeneration in adult mammals through inhibition of ROS production. *Sci. Rep.* **8**, 12170 (2018).
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. & Malik, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1126–1167 (2014).
- Mescher, A. L., Neff, A. W. & King, M. W. Inflammation and immunity in organ regeneration. *Dev. Comp. Immunol.* **66**, 98–110 (2017).
- Godwin, J. W., Pinto, A. R. & Rosenthal, N. A. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 9415–9420 (2013).
- Aurora, A. B. et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J. Clin. Investig.* **124**, 1382–1392 (2014).
- Simkin, J., Gawriluk, T. R., Gensel, J. C. & Seifert, A. W. Macrophages are necessary for epimorphic regeneration in African spiny mice. *eLife* **6**, <https://doi.org/10.7554/eLife.24623> (2017).
- Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427–439 (2010).
- Serhan, C. N., Chiang, N. & Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 349–361 (2008).
- Duffield, J. S. et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Investig.* **115**, 56–65 (2005).
- Lech, M. & Anders, H. J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 989–997 (2013).
- Munoz-Canoves, P. & Serrano, A. L. Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 449–450 (2015).
- Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737 (2011).
- Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
- Hassnain Waqas, S. F. et al. Adipose tissue macrophages develop from bone marrow-independent progenitors in *Xenopus laevis* and mouse. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 845–855 (2017).
- Schulz, C. et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**, 86–90 (2012).
- Poglio, S. et al. Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem Cells* **28**, 2065–2072 (2010).
- Poglio, S. et al. In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* **120**, 4952–4962 (2012).
- Luche, E. et al. Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease. *eLife* **6**, <https://doi.org/10.7554/eLife.23194> (2017).
- Souza-Almeida, G. et al. Leptin mediates in vivo neutrophil migration: involvement of tumor necrosis factor- α and CXCL1. *Front. Immunol.* **9**, 111 (2018).
- Gross, S. et al. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat. Med.* **15**, 455–461 (2009).
- Nishi, C., Toda, S., Segawa, K. & Nagata, S. Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1512–1520 (2014).
- Patsouris, D. et al. Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell Metab.* **8**, 301–309 (2008).
- Miller, C. L., Dykstra, B. & Eaves, C. J. Characterization of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 22, Unit 22B 22, <https://doi.org/10.1002/0471142735.im22b02s80> (2008).
- Eming, S. A., Wynn, T. A. & Martin, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* **356**, 1026–1030 (2017).
- Hubner, G. et al. Wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. *Cytokines* **8**, 548–556 (1996).
- Pineau, I. & Lacroix, S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J. Comp. Neurol.* **500**, 267–285 (2007).
- Karin, M. & Clevers, H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* **529**, 307–315 (2016).
- Nguyen-Chi, M. et al. TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. *Cell Death Dis.* **8**, e2979 (2017).
- Esser-von Bieren, J. Eicosanoids in tissue repair. *Immunol. Cell Biol.* **97**, 279–288 (2019).
- FitzSimons, M. et al. Cardiac injury modulates critical components of prostaglandin E2 signaling during zebrafish heart regeneration. *Sci. Rep.* **10**, 3095 (2020).
- Zhang, Y. et al. TISSUE REGENERATION. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science* **348**, aaa2340 (2015).
- Fontes, J. A., Rose, N. R. & Cihakova, D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* **74**, 62–68 (2015).
- Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
- Peiseler, M. & Kubes, P. More friend than foe: the emerging role of neutrophils in tissue repair. *J. Clin. Investig.* **129**, 2629–2639 (2019).
- Rampon, C., Volovitch, M., Joliot, A. & Vríz, S. Hydrogen peroxide and redox regulation of developments. *Antioxidants* **7**, <https://doi.org/10.3390/antiox7110159> (2018).
- Eisenstein, T. K. The role of opioid receptors in immune system function. *Front. Immunol.* **10**, 2904 (2019).
- Yang, W. et al. Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat. Commun.* **10**, 1076 (2019).
- Godwin, J. W., Debuque, R., Salimova, E. & Rosenthal, N. A. Heart regeneration in the salamander relies on macrophage-mediated control of fibroblast activation and the extracellular landscape. *NPJ Regen. Med.* **2**, <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0027-y> (2017).
- Petrie, T. A., Strand, N. S., Yang, C. T., Rabinowitz, J. S. & Moon, R. T. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* **141**, 2581–2591 (2014).
- Bagaitkar, J. et al. NADPH oxidase activation regulates apoptotic neutrophil clearance by murine macrophages. *Blood* **131**, 2367–2378 (2018).
- Arnold, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
- Perdiguerro, E. et al. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *J. Cell Biol.* **195**, 307–322 (2011).
- Lin, D. et al. Efferocytosis and its associated cytokines: a light on non-tumor and tumor diseases? *Mol. Ther. Oncolytics* **17**, 394–407 (2020).

47. Nagata, S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 489–517 (2018).
48. Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J. & Saltiel, A. R. Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatio-temporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**, 3239–3246 (2008).
49. Vianello, E. et al. Epicardial adipocyte hypertrophy: association with M1-polarization and toll-like receptor pathways in coronary artery disease patients. *Nutr., Metab. Cardiovasc. Dis.* **26**, 246–253 (2016).
50. Baratin, M. et al. T cell zone resident macrophages silently dispose of apoptotic cells in the lymph node. *Immunity* **47**, 349–362 e345 (2017).
51. Soroosh, P. et al. Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J. Exp. Med.* **210**, 775–788 (2013).
52. Yrlid, U. et al. Endothelial repair is dependent on CD11c(+) leukocytes to establish regrowing endothelial sheets with high cellular density. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 195–202 (2019).
53. Ngkelo, A. et al. Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J. Exp. Med.* **213**, 1353–1374 (2016).
54. Ramachandran, P. et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, E3186–E3195 (2012).
55. Kolter, J. et al. A subset of skin macrophages contributes to the surveillance and regeneration of local nerves. *Immunity* **50**, 1482–1497 e1487 (2019).
56. Lavine, K. J. et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 16029–16034 (2014).
57. Leid, J. et al. Primitive embryonic macrophages are required for coronary development and maturation. *Circ. Res.* **118**, 1498–1511 (2016).
58. Morioka, S. et al. Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. *Nature* **563**, 714–718 (2018).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. Sharif-Naeini, J. Biernaskie, and C. Sengenès for insightful discussions and manuscript proofreading. The authors also thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Toulouse, France) and specifically the zootechnical core facility for animal care and specifically the Non-Invasive Exploration service for giving access to the gamma-irradiator BioBeam 8000. Our research was supported by the French ANR Project «WAT-HEART» (ANR 16-CE14-0006-01). L.R. was a fellow of the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, FDT201904008033). V.R. is recipient of grant from French ANR Project «WAT-HEART».

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Methodology, L.R., V.R., E.L., A.C., P.M., L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Investigation, L.R., V.R., E.L., A.A., M.O., M.S., L.D.C.-F., M.A., C.G., M.-L.R., I.R.L.; Resources, B.S., M.S., G.M., P.M.; Writing—original draft, L.R., V.R., C.D.B., B.C.; Writing—review and editing, L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Funding acquisition, L.C., B.C.; Supervision, A.L., C.D.B., L.C., B.C. All the authors approved the final completed version of the manuscript. L.R. and V.R. on one hand, and A.A. and E.L. on the other hand contributed equally to this work.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00151-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.C.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



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 license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license 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 license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021