



HAL
open science

Analyse du rôle des corps cétoniques dans la polarisation fonctionnelle des macrophages humains : impact sur le processus de réparation tissulaire

Marine Monnier

► To cite this version:

Marine Monnier. Analyse du rôle des corps cétoniques dans la polarisation fonctionnelle des macrophages humains : impact sur le processus de réparation tissulaire. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2023. Français. NNT : 2023ANGE0041 . tel-04498407

HAL Id: tel-04498407

<https://theses.hal.science/tel-04498407>

Submitted on 11 Mar 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT

DE
L'UNIVERSITÉ D'ANGERS

SOUS LE SCEAU DE
LA COMUE ANGERS – LE MANS

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie-Santé
Spécialité : « Immunologie »

Par

Marine MONNIER

**« Analyse du rôle des corps cétoniques dans la polarisation
fonctionnelle des macrophages humains –
Impact sur le processus de réparation tissulaire »**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 29 novembre 2023

Unité de recherche : UMR INSERM 1307 CNRS 6075 CRCI2NA – Équipe « Immunité innée et Cancer »

Rapporteuses avant soutenance :

Dr Bénédicte CHAZAUD

Directrice de recherche, INSERM, Lyon

Pr Agnès COSTE

Professeure des Universités, Université Toulouse III – Paul Sabatier, Toulouse

Composition du Jury :

Examineurs :

Dr Dorothée DULUC

Maîtresse de conférences des Universités, Université de Bordeaux, Bordeaux

Dr Marina TROUILLAS

Chargée de recherche, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Paris

Pr Alain Morel

Professeur émérite des Universités, Université d'Angers, Angers

Directeur de thèse :

Pr Pascale JEANNIN

Professeure des Universités, Université d'Angers, Angers

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



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

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

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je remercie chaleureusement la Docteure Bénédicte Chazaud et la Professeure Agnès Coste d'avoir accepté, en tant que rapporteurs, d'apporter leur expertise et de consacrer leur temps à l'évaluation de mon travail. Je remercie également vivement les Docteurs Marina Trouillas et Dorothee Duluc ainsi que le Professeur Alain Morel d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant qu'examineurs.

Je remercie la Professeure Pascale Jeannin et le Docteur Yves Delneste de m'avoir accueilli au sein de leur équipe et de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse.

A ma directrice de thèse, la Professeure Pascale Jeannin qui m'a accordé sa confiance et m'a transmis ses connaissances en immunologie. Un grand merci pour votre dynamisme et nos échanges scientifiques ainsi que votre encadrement tout au long de ce travail de thèse.

Je remercie chaleureusement le Docteur Yves Delneste pour ses précieux conseils et sa disponibilité constante qui ont été d'une importance cruciale pour la réussite de ce projet. Un grand merci pour le temps que vous m'avez consacré, en particulier pour les relectures de ce manuscrit.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse, les Docteurs Naïg Guegen et Johan Garaude, pour leurs conseils avisés sur mon travail ainsi que pour la bienveillance dont ils ont fait preuve dans leurs retours.

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble de l'équipe 4 du CRCI2NA, anciens et actuels avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant ces années. Ce fut un réel plaisir de vous côtoyer au quotidien.

Je remercie Céline d'avoir partagé avec moi ses nombreuses connaissances techniques. Je remercie également Jonathan Dauvé, Alain Morel, Isabelle Tournier et Sabrina Fronteau pour leur aide lors de mes débuts dans le domaine de l'épigénétique. Merci à Najia pour son soutien et pour nous avoir régalaré avec ses délicieuses pâtisseries. À Raffaella, merci pour ton aide et ta présence, ce fut un plaisir de t'avoir comme voisine de bureau. Merci Nathalie pour ta gentillesse, ta bonne humeur, mais aussi pour nos nombreuses discussions autour d'un café. À Simon, merci pour tes conseils techniques, tes cours de statistiques improvisés et pour ta maîtrise parfaite de graphpad, mais aussi pour nos discussions animées sur les sujets d'actualité (quelque peu morbides parfois). À Laurence, merci de m'avoir transmis ta passion pour la biologie moléculaire à travers les connaissances et les techniques que tu m'as apportée et surtout pour ta bienveillance et ta gentillesse depuis mes débuts en master. Un grand merci à Pascale pour ton aide au quotidien, ta pédagogie, tes précieux conseils et ta disponibilité sans faille, mais surtout merci pour ta bienveillance, tes attentions spéciales et ta précieuse écoute (malgré quelques défaillances auditives ces derniers temps).

Merci également à mes co-thésards, Benoît, pour m'avoir solennellement légué son bureau (j'espère en avoir fait bon usage) et Coralie, pour nous avoir communiqué sa joie de vivre au quotidien par sa voix, ses pas de danse ou encore ses imitations (plus que réussies), rdv à Broadway l'année prochaine !

Mes remerciements vont également à tous ceux avec qui j'ai pu travailler de près ou de loin. Merci à tous pour ces belles années, ça a été un plaisir de travailler à vos côtés !

Cette thèse a aussi été l'occasion de très belles rencontres, Marie, Chloé, Chloé bis, Maxime et Benoît. Merci infiniment pour les moments précieux passés ensemble (nos soirées pékin express accompagnées d'une bonne croziflette ou de nos échecs de camemberts rôtis). Merci pour les fous rires constants et les vadrouilles, du bout de la Bretagne à l'étang de papy. Rdv aux foulées du Gois 2024 !

J'adresse une mention spéciale pour mon binôme depuis le début, Chloé, merci d'être toujours là (dans les moments de folie et de joie comme dans les moments de stress et d'angoisse), merci pour ton humour et tes expressions vendéennes bien à toi (que je comprends 1 fois sur 3) mais qui ont le don de me redonner le sourire. Tout simplement merci pour l'amie que tu es. Cette thèse n'aurait pas eu le même goût sans toi !

À mes amis, celles et ceux qui partagent mes aventures de près ou de loin mais sur lesquels je peux toujours compter, un grand merci à tous.

À mes copines, Amélie, Julie, Marine, Ariane, Charline, Audrey et Ophélie, merci de votre présence tout le temps et depuis longtemps. Merci de toujours maintenir le lien entre nous. Un merci tout particulier à Julie et Amélie pour leur soutien et d'être là pour moi à chaque fois que j'en ai eu besoin. Et à Audrey pour ta folie et ta bonne humeur dont j'ai cruellement eu besoin ces dernières semaines.

À mes supers copains beaucozéens, merci pour ces belles années d'amitié et celles à venir (Terre du son 2024 nous voilà). Un merci particulier à Théo et Paul, pour votre soutien et votre bonne humeur communicative. J'ai de la chance de tous vous avoir à mes côtés !

Enfin, je souhaite remercier ma famille, aux quatre coins du monde, mais présente en toute circonstance.

À mon frère Adam, et à mes sœurs Clémentine et Capucine, merci pour votre précieux soutien, vos oreilles attentives, vos mots réconfortant et vos encouragements qui ont été un pilier essentiel tout au long de cette thèse. Plus que tout, merci d'être les personnes sur qui je pourrai toujours compter.

À mes parents, merci pour votre amour, vos mots d'encouragements et votre soutien indéfectible qui ont été des sources de réconfort et de force inestimable dans les moments de doute. Vous m'avez appris à persévérer et à ne jamais abandonner. Merci de m'inspirer au quotidien.

Table des matières

Remerciements	3
Table des figures	8
Table des tableaux	9
Abréviations	10
Introduction	13
I. Le système immunitaire inné	13
A. Généralités	14
B. Composants de l'immunité innée	14
1. Composants cellulaires	15
a) Cellules d'origine myéloïde	15
b) Cellules d'origine lymphoïde	19
2. Composants moléculaires	20
a) Système du complément.....	21
b) Récepteurs du système immunitaire inné	21
(1) Récepteurs de l'immunité innée associés aux cellules.....	22
(2) Récepteurs solubles de l'immunité innée	24
II. Biologie des macrophages	26
A. Origine et différenciation	26
1. Ontogenèse	26
2. Facteurs de différenciation des macrophages	28
B. Propriétés des macrophages.....	30
1. Activité antimicrobienne.....	30
2. Efférocytose	31
3. Initiation et résolution de l'inflammation	31
4. Présentation des Ag/activation des LT.....	32
5. Réparation tissulaire / homéostasie tissulaire	32
6. Fonctions des macrophages résidents/tissulaires	32
7. Trained immunity.....	34
8. Tolérance	35
C. Polarisation des macrophages	35
1. Origine du concept de polarisation.....	35
2. Inducteurs et signatures des macrophages (phénotypique et cytokinique).....	37

a)	Les macrophages de type 1 (M1)	37
b)	Les macrophages de type 2 (M2)	38
3.	Modifications épigénétiques associées à la polarisation des macrophages	40
4.	Différences entre macrophages humains et murins	42
D.	Rôles physiopathologiques des macrophages	45
1.	Cancer	45
2.	Maladies inflammatoires chroniques	47
III.	Macrophages et cicatrisation	49
A.	Généralités sur le processus de réparation tissulaire et la cicatrisation cutanée	49
B.	Rôles des macrophages dans chacune des étapes du processus de réparation tissulaire	50
1.	Implication des macrophages résidents et des monocytes recrutés lors de la réponse inflammatoire	
	51	
2.	Rôles des macrophages lors de la phase de prolifération cellulaire	52
3.	Contribution des macrophages dans le remodelage tissulaire	53
C.	Pathologies – Plaies chroniques et Fibrose	54
IV.	Les corps cétoniques comme carburant alternatif	56
A.	Généralités	56
B.	Synthèse des corps cétoniques	57
C.	Rôles des corps cétoniques	58
1.	Métabolisation et utilisation comme substrat énergétique alternatif	58
2.	Corps cétoniques et signalisation cellulaire	59
a)	Transport et mécanismes de signalisation	60
b)	Corps cétoniques comme molécules de signalisation anti-inflammatoire	61
c)	Modifications épigénétiques et post-traductionnelles	61
D.	La diète cétogène	63
1.	Généralités	63
2.	Applications thérapeutiques	63
a)	Épilepsie	63
b)	Maladies neurodégénératives	64
c)	Troubles métaboliques : Diabète de type 2 et obésité	65
d)	Maladies cardiovasculaires	65
e)	Cancer	66
f)	Longévité et bien être	67

Travaux réalisés	68
I. Rationnel et objectifs de l'étude	68
II. Matériel et méthode	70
III. Résumé des résultats	70
A. L'acétoacétate confère aux macrophages humains un profil réparateur.....	70
B. La métabolisation de l'AcAc induit un phénotype réparateur médié par des modifications épigénétiques.....	71
C. Le régime cétogène accélère la cicatrisation des plaies cutanées.....	71
D. Conclusion	72
IV. Manuscrit	72
Discussion et perspectives	114
Discussion	114
A. Un signal unique qui confère aux macrophages l'acquisition de marqueurs inflammatoires puis réparateurs	114
B. Effet de la métabolisation de l'AcAc sur le profil épigénétique des macrophages.....	116
C. Réponse comportementale.....	117
D. Potentiel thérapeutique des corps cétogènes et/ou de la diète cétogène dans la réparation tissulaire	118
E. Conclusion	119
Perspectives.....	119
Références bibliographiques.....	123
Production scientifique.....	149
Table des tableaux	151
Table des illustrations.....	152
Annexes	156

Table des figures

Figure 1. Les principaux acteurs cellulaires de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.....	13
Figure 2. L'ontogénèse des macrophages chez la souris	27
Figure 3. Origine et développement des macrophages résidents d'origine embryonnaire et issus de l'hématopoïèse adulte	28
Figure 4. Représentation schématique des principales propriétés et fonctions des macrophages	30
Figure 5. Différentes propriétés et localisation des sous-populations de macrophages tissulaires.....	33
Figure 6. Représentation schématique de la classification des macrophages.....	36
Figure 7. Les modifications épigénétiques régulant la polarisation des macrophages.	41
Figure 8. Différences dans la génération et la polarisation des macrophages humains et murins.	44
Figure 9. Rôles protumoraux des macrophages associés aux tumeurs (TAM).	46
Figure 10. Étapes du processus de réparation tissulaire et implication des macrophages dans la cicatrisation	51
Figure 11. Polarisation des macrophages lors de la cicatrisation.	53
Figure 12. Synthèse et métabolisation des corps cétoniques.....	58
Figure 13. Voies de signalisation des corps cétoniques	59

Table des tableaux

Tableau 1. Les récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la réponse immunitaire	25
Tableau 2. Classification des sous-types de macrophages.....	38

Abréviations

α -KG	α -cétogluratate
AcAc	Acétoacétate
ACAT1	Acétyl-CoA Acétyltransférase 1
ACLY	ATP-citrate lyase
AGM	Aorte-gonade-mésonéphros
ALR	AIM2-like receptor
AOAA	Aminooxyacetic acid
Arg1	Arginase 1
ATP	Adénosine tri-phosphate
β -OHB	β -Hydroxybutyrate
BDH1	3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase 1
BMDM	Bone marrow-derived macrophage
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CCL	C-C motif chemokine ligand
CD	Cluster de différenciation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CoA	Coenzyme A
CLR	C-type lectin receptors
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CPT1	Carnitine palmitoyltransférase I
CRP	C-reactive protein
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DC	Dendritic cell
EGF	Epidermal growth factor
EMP	Progéniteurs érythro-myéloïdes
FAO	Fatty acid oxydation
FGF	Fibroblast growth factor
Fizz	Found in inflammatory zone 1
GLUT	Glucose transporter
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GOT	Glutamique oxaloacétique transaminase
GPR	G-protein coupled receptor

HAT	Histine acétyltransférase
HB-EGF	Heparin-binding EGF
HDAC	Histone désacétylase
HDL	High density lipoprotein
HDM	Histone déméthylase
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-CoA
HMGCL	Hydroxyméthylglutaryl-CoA lyase
HMGCS2	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase 2
HMT	Histone méthyltransférase
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukine
ILC	Innate lymphoid cells
IRF	Interferon Regulatory Factor
Jmjd3	Jumonji domain-containing protein-3
Kbhb	β -hydroxybutyrylation des lysines
KD	Régime cétogène
LDHA	Lactate deshydrogénase A
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MBL	Mannose-binding lectin
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MCT	Monocarboxylate transporter
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF- κ B	Nuclear factor kappa- β
NK	Natural killer
NLR	NOD-like receptor
NLRP3	NOD-like receptor pyrin-domain containing 3
NO	Nitric oxide

OM	Oxalomalate
OSM	Oncostatin M
OXCT1	3-oxoacid CoA-transferase 1
OXPPOS	Oxidative phosphorylation
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PDGF	Platelet-derived growth factor
PPP	Pentose phosphate pathway
PRR	Pattern recognition receptor
PTM	Modification post-traductionnelle
PTP ζ	Protein tyrosine phosphatase receptor type ζ
PTX	Pentraxine
ROS	Reactive oxygen species
SAP	Serum amyloid P
SCOT	Succinyl-CoA:3-cétoacide CoA transférase
SDH	Succinate déshydrogénase
SIRP α	Signal Regulatory protein α
SIRT	Sirtuine
SNC	Système nerveux central
SR	Scavenger receptor
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Tumor-associated macrophage
TEM	Tumor microenvironment
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Lymphocytes T régulateurs
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Introduction

I. Le système immunitaire inné

Le système immunitaire est impliqué dans la surveillance des organismes vis-à-vis des agressions endogènes (cellules mortes, cellules tumorales) et exogènes (microbes) et dans l'initiation de réponses protectrices spécifiques d'antigène. Une des caractéristiques majeures du système immunitaire est donc sa capacité à distinguer les éléments du soi et du non-soi afin d'éviter des réponses dirigées contre l'hôte.

Le système immunitaire repose sur deux composantes : le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif (Figure 1) :

- la réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les microbes et les cellules mortes ; elle est immédiate et non spécifique d'antigène,
- l'immunité adaptative génère des réponses spécifiques d'antigène et est le support de la mémoire immunitaire.

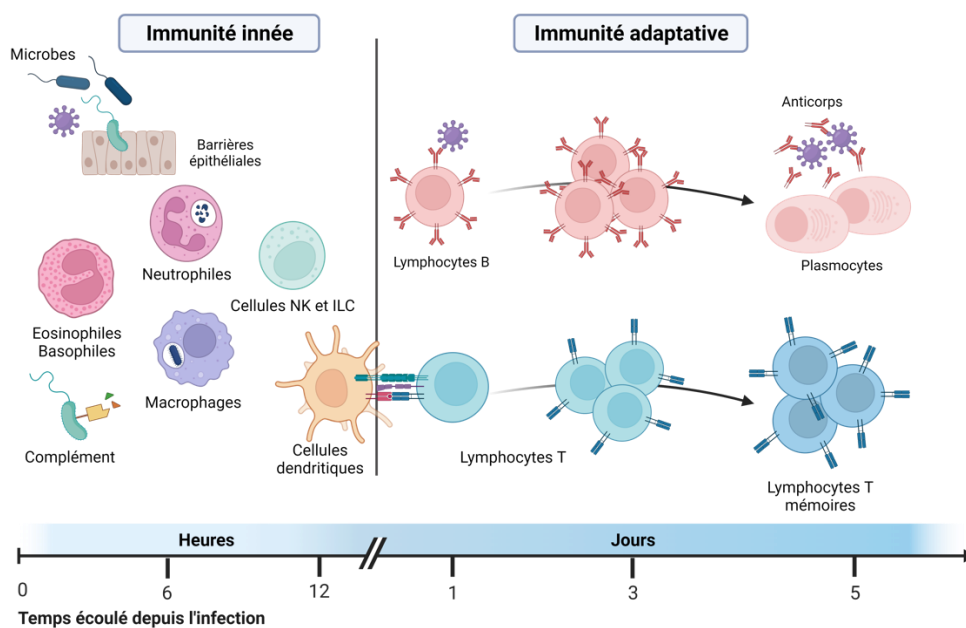


Figure 1. Les principaux acteurs cellulaires de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Le système immunitaire est composé de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. La réponse immunitaire innée se déclenche quelques minutes/heures suivant la détection d'un signal de danger et est non spécifique d'antigène. Elle fait intervenir des barrières épithéliales, des phagocytes ainsi que des cellules présentatrices d'antigène. L'immunité adaptative se déclenche plus tardivement et génère des réponses spécifiques d'antigène, supports de la mémoire immunitaire (adapté de Abbas A.K, Lichtman A.H, Pillai S (2013), Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.)

Mon projet de thèse portant sur la biologie des macrophages humains, j'ai focalisé l'introduction sur la réponse immunitaire innée.

A. Généralités

L'immunité innée, également appelée immunité naturelle, constitue la première ligne de défense de l'hôte. Elle initie une réponse rapide, dès le contact avec un microbe ou une cellule morte/anormale, est non spécifique d'antigène et s'articule autour de la détection et l'élimination des motifs reconnus. Ce système est présent dès la naissance et ne nécessite pas d'éducation préalable. L'immunité innée est médiée par une grande variété d'acteurs cellulaires et moléculaires qui coopèrent pour détecter et éliminer les microbes et les cellules « endommagées » (cellules mortes ou tumorales). Elle fait ainsi intervenir des barrières physiologiques, des phagocytes (tels que macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles), des cellules cytotoxiques (tels que les lymphocytes *Natural Killer* ou NK) et des médiateurs solubles (tels que les facteurs du complément et les récepteurs solubles de l'immunité innée).

La reconnaissance des signaux de danger est médiée par des récepteurs (connus sous le terme de *Pattern Recognition Receptors* ou PRR) spécialisés dans la reconnaissance de motifs moléculaires exprimés spécifiquement par les microbes ou les cellules mortes. Les motifs microbiens reconnus, appelés *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou PAMP, sont conservés au cours de l'évolution et ne sont pas exprimés par les cellules de l'hôte alors que les motifs endogènes (exprimés par les cellules mourantes ou anormales, comme les cellules tumorales) sont appelés *Damage-Associated Molecular Patterns* ou DAMPs.

La reconnaissance d'un motif de danger (exogène ou endogène) par les PRRs initie une cascade de signaux intracellulaires conduisant à une réponse adaptée à la nature du motif rencontré : alors que la reconnaissance des PAMPs ou de DAMPs exprimés par les cellules en apoptose tardive initie une réponse inflammatoire, la reconnaissance des cellules en apoptose précoce induit un signal de tolérance. Le système immunitaire inné joue donc un rôle central dans l'homéostasie tissulaire et le maintien de la tolérance périphérique.

B. Composants de l'immunité innée

La première barrière de protection contre les invasions microbiennes est formée par les épithéliums qui séparent physiquement les tissus conjonctifs de l'environnement extérieur. Les microbes capables de contourner cette première ligne de défense, qui fait également intervenir des médiateurs

cytotoxiques ainsi que des récepteurs solubles de l'immunité innée, vont ensuite entrer en contact avec les effecteurs cellulaires (myéloïdes et lymphoïdes) et aux composants moléculaires de l'immunité innée.

1. Composants cellulaires

Les cellules épithéliales forment des barrières physiques ; elles composent les épithéliums de la peau et des muqueuses (tractus gastro-intestinale, uro-génitale et voies respiratoires). Ces cellules sont intimement liées entre elles par des jonctions serrées qui maintiennent l'intégrité de la barrière et limitent donc l'entrée des microbes dans l'organisme. Cependant, la barrière épithéliale est plus qu'une entité physique puisqu'elle est également capable de produire du mucus, des molécules antimicrobiennes (défensines, cathélicidines), des enzymes (lysozymes, protéases, phospholipases, peptidases) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS) qui participent à l'immunité antimicrobienne. Un dialogue se crée alors entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires afin de préserver l'homéostasie tissulaire et organiser la défense de l'hôte (Schleimer et al., 2007; Larsen et al., 2020). Si un microbe contourne cette première barrière, il se heurte à une deuxième ligne de défense composée des cellules immunitaires localisées sous la barrière épithéliale.

Les cellules immunitaires de l'immunité innée sont représentées par :

- les cellules myéloïdes, comprenant les cellules polynucléées ou granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles) et les cellules mononucléées (monocytes, macrophages, cellules dendritiques),
- les cellules d'origine lymphoïde, comprenant notamment les cellules NK, les cellules NKT, les lymphocytes T $\gamma\delta$ (dits non conventionnels) et les cellules lymphoïdes innées auxiliaires (*Innate Lymphoid Cells* ou ILC).

a) Cellules d'origine myéloïde

Les cellules myéloïdes sont générées à partir de progéniteurs communs dérivés des cellules souches de la moelle osseuse.

Les cellules polynucléées sont générées dans la moelle osseuse et sont libérées au stade différencié dans la circulation sanguine d'où elles migrent dans les tissus. Elles sont caractérisées par la présence de granules intracytoplasmiques qui contiennent, notamment, des molécules antimicrobiennes préformées ; le contenu des granules est libéré vers l'espace extracellulaire lors d'une stimulation.

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants de la circulation sanguine, représentant de 50 à 70% des leucocytes circulants chez l'homme (Witko-Sarsat et al., 2000; Liew and Kubes, 2019). Les neutrophiles sont recrutés sur les sites d'infection/inflammation et participent à la défense contre de nombreux types de microbes (bactéries, protozoaires, levures) (Mayadas et al., 2014). Ils participent à l'élimination des micro-organismes par phagocytose (formation d'un phagosome et fusion avec les granules cytoplasmiques pour former le phagolysosome), libération des molécules microbicides ou encore formation de pièges extracellulaires (*Neutrophil Extracellular Traps* ou NETs) (Liew and Kubes, 2019).

Les granules cytoplasmiques des neutrophiles sont classés en quatre types en fonction de leur contenu (Borregaard and Cowland, 1997):

- les **granules primaires ou azurophiles** caractérisés par la présence de la myéloperoxydase (MPO), de protéases (cathepsine G, élastase, protéinase 3) et de défensines. Ces granules sont les premiers produits au cours du développement des neutrophiles,
- les **granules secondaires ou spécifiques** sont enrichis en lactoferrine,
- les **granules tertiaires ou gélatinases** contiennent les métalloprotéinases matricielles (telles que la *Matrix Metalloproteinase 9* ou MMP9),
- les **vésicules sécrétoires** contiennent des protéines plasmatiques telle que l'albumine sérique.

La libération des granules se produit de manière contrôlée et séquentielle (vésicules sécrétoires → granules tertiaires → granules secondaires → granules primaires) afin de limiter l'exposition des cellules aux molécules cytotoxiques (Sengeløv et al., 1993). Les ROS, induits par l'activation du complexe NADPH oxydase, sont des acteurs majeurs de l'activité bactéricide des neutrophiles. De plus, les neutrophiles sont capables de libérer des fibres de chromatine et des enzymes antimicrobiennes formant un réseau extracellulaire d'ADN (NETs) pour capturer et éliminer les microbes extracellulaires (Bell, 2004; Papayannopoulos, 2018).

Bien qu'ils soient traditionnellement décrits pour leur rôle anti-microbien, les neutrophiles peuvent également présenter des activités immunorégulatrices. Sur la base de la dichotomie M1/M2 décrite pour les macrophages, des études ont décrit deux sous-populations de neutrophiles, N1 et N2, associés aux tumeurs (*Tumor-Associated Neutrophils* ou TAN). Les neutrophiles N1 présentent une capacité de phagocytose et une cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales alors que les neutrophiles N2 sont associés à une réponse inflammatoire chronique et à la promotion de la tumorigénèse (Kobayashi, 2015; Giese et al., 2019).

Les basophiles et les éosinophiles représentent de 1 à 5% des leucocytes circulants (Nadif et al., 2013). Ils présentent une activité antimicrobienne (notamment anti-parasitaire) et sont impliqués dans les réactions allergiques.

Les basophiles sécrètent de l'IL-4, cytokine clé dans la production d'IgE, ainsi que de nombreux médiateurs, tels que l'histamine, des protéoglycanes, des enzymes protéolytiques, des cytotoxines et des peptides anti-microbiens (défensines) impliqués dans les réactions inflammatoires, allergiques et antiparasitaires (Karasuyama et al., 2011).

Lorsqu'ils sont activés, les éosinophiles libèrent rapidement des ROS et des médiateurs lipidiques leur conférant un rôle pro-inflammatoire. Ils sont impliqués dans les réponses antiparasitaires (notamment contre les helminthes) (Rothenberg and Hogan, 2006; Ravin and Loy, 2016). Parmi les molécules contenues dans leurs granules, nous pouvons citer la MBP (*Major Basic Protein* ou PRG2), l'ECP (*Eosinophil Cationic Protein*), l'EDN (*Eosinophil-Derived Neurotoxin*) et l'EPO (*Eosinophil Peroxydase*) qui présentent des activités cytolytiques (Decot and Capron, 2006).

Après dégranulation, les granulocytes sont éliminés par phagocytose par les macrophages.

Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA), c'est-à-dire qu'elles sont capables d'induire/activer une réponse immunitaire adaptative en présentant des peptides antigéniques aux lymphocytes T via leur complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et de classe II (CMH-II). Alors que toutes les CPA sont capables de stimuler les lymphocytes T activés ou mémoires, seules les cellules dendritiques (DCs) sont capables de stimuler des lymphocytes T naïfs ; elles sont ainsi qualifiées de CPA « professionnelles ». Les mécanismes d'apprêtement des antigènes seront détaillés dans la section II sur la biologie des macrophages.

Les monocytes sont générés dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (2 à 10% des leucocytes), puis sont libérés dans le sang où ils circulent avant d'être recrutés dans les tissus en cas d'infection ou d'inflammation. Les monocytes se différencient alors en macrophages ou en DC en fonction de la nature des signaux reçus localement. Les cellules myéloïdes mononucléées sont capables d'éliminer les micro-organismes et les débris cellulaires/cellules mortes par phagocytose et sont également impliquées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T.

Les DCs résident dans les tissus périphériques à l'état immature. Une fois un antigène capturé, elles migrent vers la zone T des organes lymphoïdes secondaires pour achever leur processus de maturation et présenter les peptides antigéniques aux cellules T naïves (*priming*). Plusieurs signaux induisent la maturation des DCs, tels que les PAMPs, les cytokines inflammatoires ou encore la molécule CD40

ligand (CD40L) exprimée par les lymphocytes T (LT) activés. Le processus de maturation est caractérisé par une redistribution des molécules du CMH-II des compartiments endocytaires à la surface des DCs, une diminution de la capacité d'internalisation des antigènes, une augmentation des molécules de costimulation et d'adhérence ainsi que des changements morphologiques (réorganisation du cytosquelette). Les DCs jouent également un rôle clé dans le maintien de la tolérance au soi car elles sont impliquées dans la sélection négative des lymphocytes T au niveau du thymus et au niveau des ganglions lymphatiques (Merad et al., 2013).

La biologie des macrophages sera détaillée dans la section II.

Les cellules myéloïdes représentent une interface importante entre immunité innée et immunité adaptative par :

- la capacité à présenter des antigènes aux lymphocytes,
- le contrôle de l'inflammation par la production de cytokines et de chimiokines,
- la production de cytokines impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire adaptative (telles que l'IL-12 qui active les cellules Th1, l'IL-23 qui active les cellules Th17 ou encore l'IL-10 qui active les lymphocytes T régulateurs).

Cependant en condition pathologiques, tel que le cancer et les pathologies inflammatoires chroniques, le processus de différenciation des cellules myéloïdes est altéré et fait émerger une population hétérogène de cellules myéloïdes appelées cellules myéloïdes suppressives ou MDSC (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Les MDSC possèdent une puissante activité immunosuppressive, illustrée notamment par la capacité à inhiber les lymphocytes T. L'activation des MDSC induit l'expression de facteurs immunosuppresseurs tels que l'arginase 1 ou iNOS impliqués dans la production de ROS et de NO (Gabrilovich, 2017; Hegde et al., 2021). Le terme "MDSC" semble donc associé à un état fonctionnel observé lors d'un contexte pathologique, plutôt qu'à une sous-population clairement définie. Deux sous-ensembles de MDSC ont été identifiés sur la base de leur phénotype et de leur morphologie : un sous-groupe de type granulocytaire ou G-MDSC (présentant des caractères des neutrophiles) et un sous-groupe monocyttaire ou M-MDSC (présentant des caractéristiques des monocytes) (Peranzoni et al., 2010).

La myélopoïèse des MDSC dans un contexte tumoral contribue à la progression de la tumeur en participant à la mise en place d'un environnement immunosuppresseur ainsi qu'à l'angiogenèse, au processus métastatique et à la résistance aux traitements. Initialement décrites dans le cancer, ces cellules contribuent également à l'inhibition de la réponse immunitaire dans d'autres pathologies notamment associées à une inflammation chronique.

b) Cellules d'origine lymphoïde

Les cellules NK représentent le principal sous-ensemble de lymphocytes du système immunitaire inné ; elles représentent 5 à 20% des lymphocytes circulants chez l'homme (Langers et al., 2012). Ces cellules sont impliquées dans la défense contre les infections microbiennes et participent à l'immunosurveillance tumorale (tout en épargnant les cellules du soi) (Vivier et al., 2008). Les cellules NK ont une activité cytotoxique médiée par des cytokines (telles que le $TNF\alpha$) et des protéines cytotoxiques (perforines et granzymes) contenues dans les granules et libérées lorsque les cellules sont activées. Les cellules NK sont générées dans la moelle osseuse ainsi que dans des sites extra médullaires (tissus lymphoïdes secondaires, foie, utérus) (Scoville et al., 2017). Les cellules NK, dépourvues du récepteur des lymphocytes T (*T cell receptor* ou TCR), sont caractérisées par l'expression des marqueurs de surface CD56, CD16, d'hétérodimères CD94/NKG2 et de récepteurs de type immunoglobuline. Les cellules NK peuvent être classées en deux sous populations en fonction du niveau d'expression de CD56 : CD56^{bright} et CD56^{dim}. Les cellules NK CD56^{bright} ont une faible activité cytotoxique et produisent des cytokines (telles que l' $IFN\gamma$) tandis que les cellules NK CD56^{dim} ont une activité cytotoxique plus importante (Perera Molligoda Arachchige, 2021). L'activation des cellules NK est contrôlée par des récepteurs inhibiteurs (*Killer inhibitor receptors* ou KIR) ou activateurs (*Killer activator receptors* ou KAR). En condition homéostatique, le principal signal reçu par les cellules NK est un signal inhibiteur provenant de l'interaction des récepteurs KIRs avec des niveaux normaux de molécules du CMH-I par les cellules saines. En revanche, une expression réduite de molécules du CMH-I par les cellules anormales (cellules infectées par un virus ou tumorales) entraîne une diminution des signaux inhibiteurs via les KIR au profit d'une signalisation via les récepteurs activateurs KAR, résultant en l'activation cellulaire. L'équilibre entre les signaux activateurs et inhibiteurs joue un rôle clé dans la régulation de l'activité des cellules NK.

Les cellules NKT (*Natural Killer T cell*) possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK et des LT (Godfrey et al., 2010). Ces cellules sont un sous ensemble rare des cellules T qui représente moins de 1% des lymphocytes du sang périphérique chez l'homme. Elles expriment un TCR « semi-invariant » impliqué dans la reconnaissance des antigènes glycolipidiques présentés par la protéine CD1d. Les cellules NKT partagent les marqueurs CD56 et CD16 avec les cellules NK. Les cellules NKT sont divisées en trois groupes, selon l'expression de leur TCR et leur réactivité antigénique : NKT de type I ou invariants (iNKT), NKT de type II ou variants (NKTv) et NKT-like. Les cellules iNKT et NKTv sont restreintes par la molécule CD1d qui présente des glycolipides alors que les cellules NKT-like sont restreintes par d'autres molécules non polymorphiques (telles que CD1a, CD1b ou CD1c). L'activation

des cellules NKT induit la libération de nombreuses cytokines (TNF- α , IL-4, IL-10, IFN γ) et elles participent à la maturation des cellules B et à la production d'immunoglobulines (Zeng et al., 2013). Elles forment donc un pont entre immunité innée et immunité adaptative, notamment par leur capacité de reconnaissance et de réponse aux antigènes glycolipidiques.

Les lymphocytes T non conventionnels $\gamma\delta$ sont une sous-population de lymphocytes T qui expriment un TCR constitué d'une combinaison de chaînes γ et δ (Bonneville et al., 2010; Hovav, 2017). Ils sont moins abondants que les lymphocytes T $\alpha\beta$ dans le sang périphérique mais sont enrichis dans les sites muqueux et épithéliaux. Ils présentent des caractéristiques de cellules immunitaires innées et adaptatives et sont impliqués dans les réponses anti-infectieuses et antitumorales. Ces cellules produisent de grandes quantités de cytokines comme l'IFN γ , l'IL-17 et le TNF α .

Les ILCs auxiliaires sont répartis en trois groupes (ILC1, ILC2, ILC3) qui reflètent les fonctions des lymphocytes Th1, Th2 et Th17. Contrairement aux lymphocytes B et T, les ILCs n'expriment pas de TCR mais il existe des similarités entre les ILCs et les lymphocytes T, notamment par les facteurs de transcription et les cytokines produites. Les ILC1 et les lymphocytes Th1 expriment le facteur de transcription T-bet (*T-box expressed in T cells*) et produisent de l'IFN γ . Les ILC2, comme les cellules Th2, expriment le facteur de transcription GATA-3 et produisent de l'IL-5 et de l'IL-13. Les ILC3 et les lymphocytes Th17 expriment le facteur de transcription ROR γ T et produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 (Spits et al., 2013). Les ILC1 sont activés par l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 lors d'une infection microbienne et produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN γ et le TNF α . Les ILC2, activés par l'IL-25 et l'IL-33, sont impliqués dans la réponse contre les parasites en régulant le développement des cellules épithéliales de l'intestin. Ils produisent de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 qui contribuent à l'élimination de parasites en activant les macrophages de type 2. Enfin, les ILC3 sont activés par l'IL-23 et l'IL-1 β produites par les DCs et sont enrichis au niveau des muqueuses. Ils sont impliqués dans la défense contre les infections par des microbes extracellulaires (en particulier au niveau intestinal) et favorisent le recrutement des neutrophiles ainsi que la production de peptides antimicrobiens (Crinier et al., 2017).

2. Composants moléculaires

La réponse immunitaire innée comprend de nombreux facteurs solubles, présents constitutivement dans les fluides biologiques ou produits suite à une activation. Ces médiateurs solubles, qui constituent la composante humorale de l'immunité innée, comprennent : les cytokines et les chimiokines, qui

jouent un rôle central dans la régulation des différentes phases des réponses immunitaires, le système du complément et les PRR.

a) *Système du complément*

Le système du complément est un ensemble de protéines circulantes, produites par le foie sous forme inactive, qui participent à l'élimination des microbes et à l'homéostasie cellulaire (élimination des cellules apoptotiques). L'activation des protéines du complément est induite par le clivage protéolytique de ces protéines. Les trois principales voies d'activation du complément sont :

- la **voie classique**, initiée par la fixation du complexe protéique C1 du complément, soit directement sur le microorganisme, soit sur un complexe anticorps-antigène,
- la **voie des lectines** (*Mannose-binding lectin* ou MBL), activée par fixation de la protéine MBL sur le résidu mannose présent à la surface des microbes,
- la **voie alterne**, activée de manière spontanée (contrairement à la voie classique et des lectines) par la fixation de la protéine C3b à la surface des microbes.

L'activation en cascade du système du complément conduit à l'activation de la protéine C3 convertase qui clive la protéine C3 en deux fragments : C3a et C3b. Le fragment C3b contribue à la formation de la C5 convertase par liaison covalente à la surface du microbe. La C5 convertase va ensuite cliver la protéine C5 (C5a et C5b) pour former le complexe d'attaque membranaire (CAM) en combinant le fragment C5b avec d'autres protéines du complément (C6, C7, C8 et C9). Produit final de la cascade du complément, le CAM induit la formation d'un pore dans la membrane bactérienne, conduisant à une lyse osmotique.

Le fragment C3b agit comme une opsonine, facilitant la phagocytose des microbes. De plus, le système du complément présente un rôle inflammatoire : les fragments C3a et C5a induisent le recrutement et l'activation des leucocytes et stimulent la production de cytokines inflammatoires (Dunkelberger and Song, 2010).

b) *Récepteurs du système immunitaire inné*

Les cellules de l'immunité innée expriment des PRR, récepteurs impliqués dans la reconnaissance de signaux de danger (Akira et al., 2006; Turvey and Broide, 2010). Exprimés par de nombreux types cellulaires, et notamment par les cellules de l'immunité innée, ils sont localisés dans différents compartiments cellulaires (membrane plasmique, endosomes, cytoplasme) et reconnaissent des

motifs moléculaires exprimés sélectivement par les microbes ou par des cellules mortes. Parmi les DAMPs se trouvent les protéines du choc thermique (heat shock proteins ou HSP), l'acide urique, l'ATP extracellulaire ou encore la molécule *High mobility group 1* (HMGB1).

Les PRRs peuvent être schématiquement classés en deux sous-familles : les récepteurs associés aux cellules (récepteurs d'endocytose et récepteurs de signalisation) et les récepteurs solubles (Tableau 1).

(1) Récepteurs de l'immunité innée associés aux cellules

Les PRRs associés aux cellules peuvent être classés en deux familles : (i) les récepteurs d'endocytose comprenant notamment les récepteurs d'épuration (*Scavenger Receptors* ou SR) et les récepteurs aux lectines de type-C (*C-type lectin receptors* ou CLR), et (ii) les récepteurs de signalisation impliqués dans l'activation cellulaire, et comprenant les récepteurs de type Toll (*Toll-Like Receptors* ou TLR), de type NOD (*NOD-Like Receptors* ou NLR), de type RIG (*RIG-Like Receptors* ou RLR) et de type AIM2 (*AIM2-Like Receptor* ou ALR) (Gordon 2002) (Tableau 1).

- **Les récepteurs d'endocytose :**

Les récepteurs d'endocytose sont impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation des microbes et des cellules mortes.

Les SRs sont principalement exprimés à la surface des cellules endothéliales, des macrophages et des DCs (Gough and Gordon, 2000). Ils sont composés de protéines multi-domaines et regroupés en huit classes (A à L) selon leur structure. Initialement impliqués dans le transport des lipides et l'internalisation des lipoprotéines de basse densité tels que les LDL oxydés (Ox-LDL), les SRs sont également impliqués dans la reconnaissance de ligands présents à la surface des cellules mortes et d'une grande variété de microbes (Canton et al., 2013; Abdul Zani et al., 2015). L'élimination par les SR est principalement médiée par endocytose. En plus de jouer un rôle dans l'homéostasie tissulaire, les SRs sont également impliqués dans la pathogénèse de certaines maladies (neurodégénérescence, athérosclérose, troubles métaboliques).

Les CLR constituent une famille de récepteurs spécialisés dans la reconnaissance des carbohydrates de manière dépendante du calcium via les motifs *Carbohydrate Recognition Domain* (CRD). Ils sont principalement exprimés à la surface des CPA. Les CLR sont différenciés sur la base de leur structure et regroupent les CLR membranaires dits de type I dont les prototypes sont les molécules Dectin, DC-SIGN et DNGR-I et les CLR solubles qui seront détaillés dans le paragraphe dédié. Les CLR participent

à l'endocytose des microbes et à la signalisation intracellulaire conduisant à l'activation des cellules immunitaires.

- **Les récepteurs de signalisation :**

Les TLR sont des protéines transmembranaires présentant un domaine extracellulaire qui reconnaît les PAMPs (domaine de liaison composé de motifs riche en leucine) et un domaine intracellulaire de type *Toll-like IL-1 Receptor* (TIR) impliqué dans la signalisation intracellulaire. A ce jour, 10 TLR ont été décrits chez l'homme. Ils sont localisés à la surface des cellules (TLR-1, -2, -4, -5 et -6) ou dans des endosomes (TLR-3, -7, -8 et -9).

Les TLR reconnaissent une grande diversité de motifs moléculaires : ADN double brin non méthylé (CpG) (TLR-9), ARN viraux simple et double brin (TLR-3, -7 et -8), lipopeptides (TLR-1, -2 et -6), lipopolysaccharides (LPS) (TLR-4) et flagelline (TLR-5). Les TLR impliqués dans la reconnaissance des protéines, des lipides et des polysaccharides microbiens sont exprimés à la surface des cellules alors que les TLR reconnaissant les acides nucléiques sont localisés dans les endosomes. L'activation via les TLR initie une cascade de signalisation intracellulaire impliquant les facteurs de transcription NF-κB (nuclear factor-kappa B) et IRF (Interferon Regulatory Factor) et conduisant à l'expression de gènes codant des cytokines inflammatoires et antivirales (Delneste et al., 2007; Kawai and Akira, 2010).

Les récepteurs NLR et RLR reconnaissent, respectivement, des composés bactériens et viraux et sont localisés dans le cytoplasme. Les récepteurs NLR comprennent les protéines NOD1 et NOD2. NOD1 est impliqué dans la reconnaissance de peptidoglycanes bactériens (tel que l'acide γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelique ou DAP), tandis que NOD2 reconnaît le muramyl dipeptide. L'activation des NLR conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules antimicrobiennes.

Les récepteurs RLR sont impliqués dans la détection des ARNs viraux. L'activation via les récepteurs RIG-I (*Retinoic acid inducible gene-1*) et MDA5 (*Melanoma differentiation-associated protein*) conduit à la production d'interférons de type I et de cytokines pro-inflammatoires.

La famille *AIM2-like receptors* (ALR) sont des PRRs intracellulaires qui détectent les acides nucléiques d'origine microbienne (bactérie ou virus) ou cellulaire (noyau ou mitochondrie) présents dans le cytoplasme. Cette famille comprend les molécules AIM2 (*Absent in melanoma 2*), IFI16 (*Interferon gamma inducible protein 16*), IFIX (*Interferon-inducible protein X*) et MNDA (*Myeloid nuclear differentiation antigen*). Le principal membre de cette famille est le récepteur AIM2. Après fixation à de l'ADN, AIM2 forme un complexe de type inflammasome en se combinant à l'adaptateur ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) et à la caspase-1. L'activation de l'inflammasome conduit à la maturation et à la libération des cytokines inflammatoires IL-1 β et IL-18.

(2) Récepteurs solubles de l'immunité innée

Les PRRs solubles sont des protéines qui se fixent aux PAMPs et aux DAMPS, facilitant l'élimination des microbes et des cellules apoptotiques par les phagocytes. Les PRRs solubles participent également à l'activation du complément et modulent la réponse inflammatoire. Les PRRs solubles sont regroupés en trois grandes familles : les collectines, les ficolines et les pentraxines (Tableau 1).

Les collectines appartiennent à la famille des CLR. Ce sont des protéines multimériques composées d'un domaine collagène et d'un domaine de liaison glucidique. Les membres de cette famille sont les molécules MBL et les surfactants SP-A et SP-D. Les collectines reconnaissent les micro-organismes via les domaines CRD. La protéine MBL, composant initial de la voie des lectines du complément, se fixe à la surface de nombreux microbes (bactéries, champignons, virus) et participe à l'activation du complément. MBL coopère avec le composant C1q du complément dans l'élimination des cellules apoptotiques. Les protéines SP-A et SP-D sont également impliquées dans l'élimination des cellules mortes (Schagat et al., 2001).

La famille des ficolines regroupe trois membres : Ficolin-1, Ficolin-2 et Ficolin-3. Leur structure est semblable à celle des collectines avec un domaine de type collagène N-terminal et possèdent un domaine C-globulaire de type fibrinogène. Les ficolines sont capables de reconnaître spécifiquement des polysaccharides microbiens (motif N-acétyl) tel que la N-acétylglucosamine. Les ficolines participent à l'élimination des bactéries par la voie des lectines du complément (Endo et al., 2011).

Les pentraxines sont divisées en deux groupes : les pentraxines courtes avec CRP (*C-reactive protein*) et SAP (*Serum amyloid P*) et les pentraxines longues, dont le prototype est la molécule PTX3 (*Pentraxin 3*). Les pentraxines opsonisent des microbes et des cellules en apoptose tardive, conduisant notamment à l'activation des voies classique et alterne du complément (Bottazi et al., 2010).

Tableau 1. Les récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la réponse immunitaire

Localisation	Famille de récepteurs	Récepteurs PRR	Motifs reconnus
Membrane plasmique	TLR membranaires	TL1, TLR2, TLR6	Lipopetides bactériens
		TLR2	Peptidoglycanes bactériens
		TLR4	LPS
		TLR5	Flagelline bactérienne
	Récepteurs de type lectine C (CLR)	Dectin, DC-SIGN, DNGR-I	Carbohydrates (mannose, fucose, β -glucan)
Récepteurs scavenger (SR)	SR de A à L	ox-LDL, LPS, phosphatidylsérine	
Endosome	TLR endosomaux	TLR3	ARNdb
		TLR7, TLR8	ARNsb
		TLR9	ADN CpG
Cytosol	Récepteurs de type NLR	NOD1	Peptidoglycanes bactériens
		NOD2	Muramyl dipeptide
	Récepteurs de type RLR	RIG-I, MDA5	ARN viral
	Récepteurs de type ALR	AIM2, IFI16, IFIX, MNDA	ADN microbien cytosolique
Extracellulaire	Collectines	MBL	Mannose, fucose, N-acetylglucosamine
		SP-A, SP-D	LPS, glucides
	Ficolines	Ficolin-1, Ficolin-2, Ficolin-3	LPS, N-acetylglucosamine, acide sialique
	Pentraxines	CRP	Phosphorylcholine, polysaccharides
		PTX3	Liaisons à la matrice extracellulaire

II. Biologie des macrophages

Le terme macrophage a été utilisé pour la première fois par Elie Metchnikoff pour décrire des cellules mobiles capables de phagocyter des pathogènes. Cette découverte lui vaudra, avec Paul Ehrlich, l'attribution du prix Nobel de physiologie ou médecine en 1908.

Initialement décrites comme des cellules « éboueurs » impliquées dans l'élimination des microbes et des débris cellulaires, les macrophages apparaissent aujourd'hui comme des cellules avec une biologie complexe et présentant de nombreuses fonctions, telles que l'initiation et la résolution de l'inflammation, la régulation des réponses immunitaires adaptatives, l'homéostasie et la réparation tissulaire (Biswas and Mantovani, 2012). De plus, leurs fonctions sont finement contrôlées par la nature de leur environnement tissulaire. Cette capacité d'adaptation, couramment désignée par le terme plasticité, conduit à une large diversité de phénotypes rendant compliquée l'étude de leurs fonctions.

A. Origine et différenciation

1. Ontogenèse

Le concept initial soutenait que les macrophages résidents dans les tissus à l'âge adulte dépendaient du recrutement et de la différenciation des monocytes circulant dérivés de la moelle osseuse (van Furth and Cohn, 1968). Cependant, cette notion a évolué ces dernières années vers un nouveau concept suggérant que certaines populations de macrophages résidents proviennent de l'hématopoïèse embryonnaire et s'auto-entretiennent, indépendamment de la moelle osseuse, à l'âge adulte (Hoeffel and Ginhoux, 2018). L'ontogénèse des macrophages est principalement décrite chez la souris (Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013) et il n'existe que peu de données chez l'Homme (Figure 2).

Chez la souris, l'hématopoïèse embryonnaire se produit en trois vagues successives provenant de sites extra- et intra-embryonnaires. Les deux premières vagues ont lieu dans le sac vitellin extra-embryonnaire. La première vague, appelée hématopoïèse primitive, se développe à partir du mésoderme du sac vitellin autour du 7^{ème} jour embryonnaire (E7.0), donnant naissance aux érythroblastes, mégacaryocytes et macrophages primitifs (Ginhoux and Williams, 2016; Hoeffel and Ginhoux, 2018). La deuxième vague (ou vague transitoire définitive) a pour origine l'endothélium hémogénique du sac vitellin entre E8.0 et E8.5. Une fois la circulation sanguine établie à E8.5, les EMPs

(*Erythro myeloid progenitor*) migrent dans le foie foetal. La 3^{ème} vague se produit dans la région de l'aorte-gonade-mésonephros (à partir de E10.5) et est à l'origine de l'hématopoïèse adulte (Figure 2).

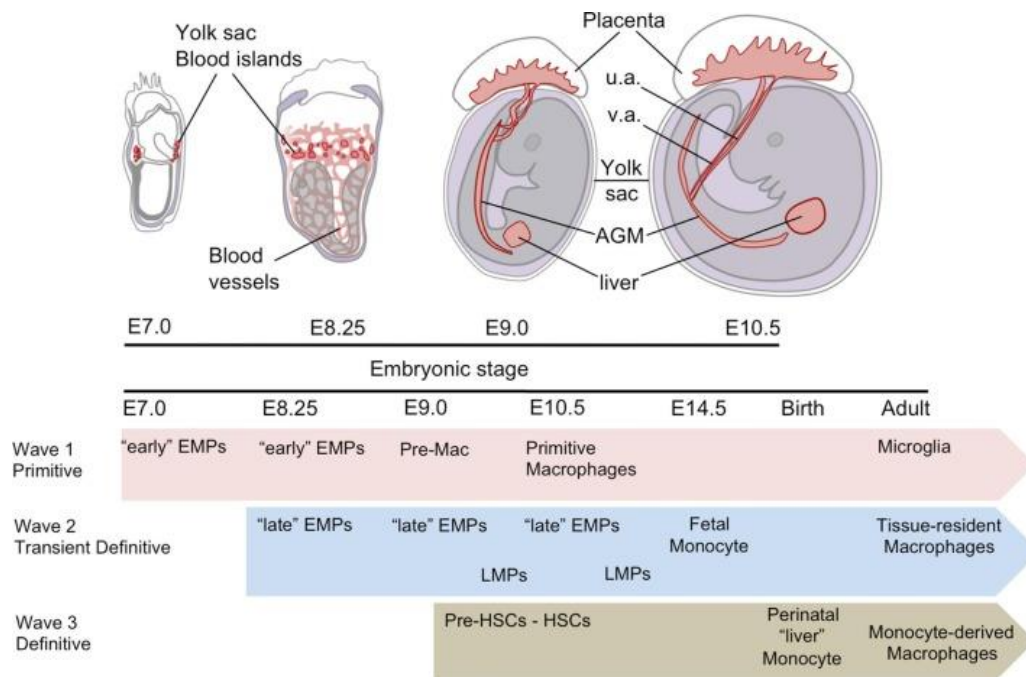


Figure 2. L'ontogénèse des macrophages chez la souris. L'hématopoïèse se déroule en trois vagues. La première vague commence à E7.0 dans le sac vitellin est impliquée dans la génération de macrophages et d'érythrocytes primitifs qui donnent naissance à la microglie adulte. Lors de la deuxième vague, les progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP) donnent naissance aux monocytes foetaux qui donneront à leur tour des macrophages résidents. Enfin, la troisième vague commence à E10.5 avec l'émergence de la première cellule souche hématopoïétique (HSC) dans la région de l'aorte-gonade-mésonephros (AGM). Figure tirée de (Hoeffel and Ginhoux, 2018).

Selon le tissu et le contexte physiologique, les macrophages d'origine embryonnaire peuvent s'auto-renouveler localement (cerveau, poumon, épiderme) ou être remplacés à l'âge adulte par des monocytes circulant (intestin, cœur et derme) (Ginhoux and Williams, 2016) (Figure 3). Chez l'homme, l'ontogénie des macrophages tissulaires reste difficile à déterminer mais il est admis que les monocytes sont les principaux précurseurs de macrophages tissulaires.

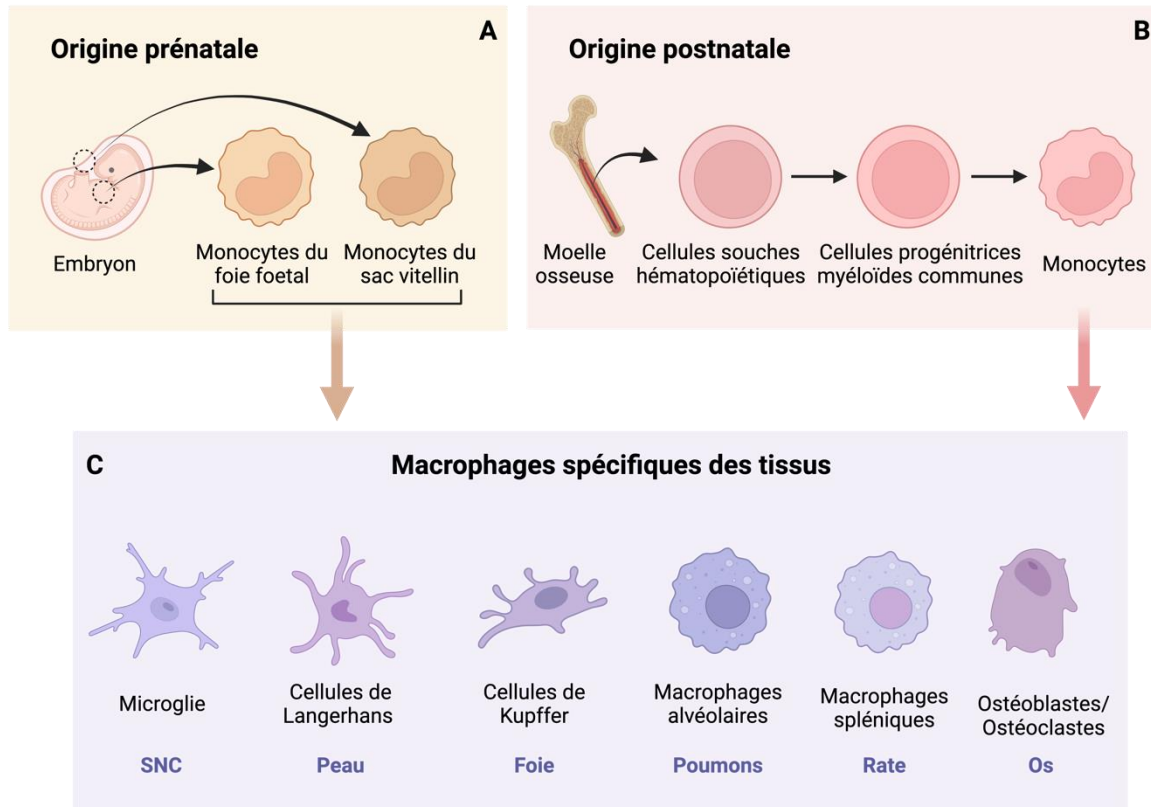


Figure 3. Origine et développement des macrophages résidents d'origine embryonnaire et issus de l'hématopoïèse adulte. Les macrophages adultes tissulaires peuvent avoir une origine embryonnaire et dériver des monocytes du foie fœtal et des monocytes du sac vitellin (A) ou se développer à partir des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse après avoir subi plusieurs étapes de différenciation (B). Les monocytes migrent ensuite dans les tissus et se différencient en macrophages spécifiques aux tissus (C).

2. Facteurs de différenciation des macrophages

Chez l'Homme, les principaux facteurs de survie des macrophages sont les cytokines M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*), GM-CSF (*Granulocytes Colony-Stimulating Factor*) et l'interleukine 34 (IL-34). Ces facteurs permettent la survie des monocytes, induisent leur différenciation en macrophages et contrôlent leur polarisation (Jeannin et al., 2018).

Le M-CSF (CSF-1) est le principal régulateur de la différenciation et de la survie des macrophages (Chitu and Stanley, 2006; Hamilton, 2008). Le M-CSF, contrairement aux autres CSF, est présent à des niveaux élevés dans le sang et est exprimé de façon constitutive par de nombreux tissus et types cellulaires (tels que les fibroblastes, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les ostéoblastes). Plusieurs isoformes ont été décrites : glycoprotéine sécrétée, protéine de surface et protéine associée aux protéoglycanes. Le récepteur du M-CSF, CSF-1R (également appelé CD115 ou c-fms), est un récepteur

homodimérique présentant une activité tyrosine kinase. La signalisation via CSF-1R génère des signaux de survie pour les macrophages.

Plusieurs études ont montré l'importance du M-CSF dans le développement des différentes populations de phagocytes mononucléés, dont les macrophages. Les souris déficientes en CSF-1 (*Csf1^{op/op}*) présentent une augmentation de la masse osseuse (ostéopétrose) consécutive à la perte des ostéoclastes (Dai et al., 2002) et les souris déficientes pour le récepteur CSF-1R (*Csf1r^{-/-}*) présentent une déplétion sévère en macrophages. La non superposition des phénotypes de ces deux lignées de souris démontraient que le CSF-1R est le seul récepteur du M-CSF mais suggéraient également l'existence d'un autre ligand (Chitu and Stanley, 2017).

Lin et al ont identifié l'IL-34 comme un deuxième ligand du CSF-1R. Synthétisée sous la forme d'une glycoprotéine homodimérique (Lin et al., 2008), l'IL-34 se fixe au CSF-1R avec une plus grande affinité que le M-CSF (Chihara et al., 2010). L'IL-34, mais pas le M-CSF, pourrait également se lier au récepteur PTP ζ , exprimé uniquement dans le cerveau et le rein, et à la molécule CD138 qui se comporterait comme un co-récepteur (Nandi et al., 2013; Segaliny et al., 2015). L'IL-34 est un facteur de survie des monocytes et induit leur différenciation en macrophages ; l'IL-34 induit également la prolifération des macrophages murins. En condition physiologique, l'IL-34 est produite de manière constitutive dans l'épiderme et le cerveau alors que de nombreux types cellulaires la produisent en condition inflammatoire.

Le GM-CSF (ou CSF-2) est une protéine monomérique glycosylée. Le récepteur au GM-CSF (GM-CSFR, CSF-2R ou CD116) est un hétérodimère constitué d'une chaîne α unique de liaison au ligand et d'une chaîne β commune avec les récepteurs de l'IL-3 et de l'IL-5. CSF-2R est exprimé par les monocytes/macrophages, éosinophiles, neutrophiles et cellules endothéliales. Chez les sujets sains, le GM-CSF est indétectable dans la circulation et sa production est induite en cas d'infection ou d'inflammation. Il joue un rôle clé dans l'hématopoïèse en régulant la différenciation des progéniteurs en DC et en macrophages. Contrairement au M-CSF qui favorise principalement la différenciation des monocytes humains en macrophages de type M2, le GM-CSF est nécessaire à la génération des macrophages de type M1. Le GM-CSF régule également l'expression des gènes anti-apoptotiques dans les cellules myéloïdes, favorisant ainsi la survie des macrophages.

B. Propriétés des macrophages

Les macrophages sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, notamment la défense contre les infections, la régulation de l'inflammation, la présentation antigénique et la réparation tissulaire (Figure 4).

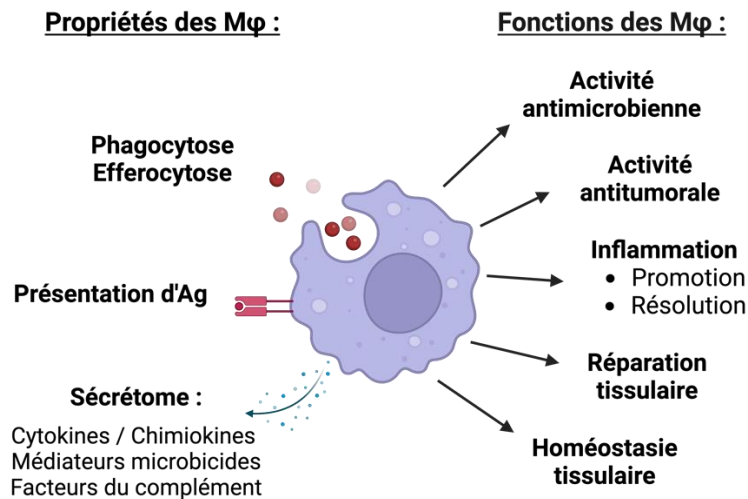


Figure 4. Représentation schématique des principales propriétés et fonctions des macrophages. Les macrophages jouent un rôle central dans l'immunité en phagocytant les microbes et les cellules mortes, en présentant les antigènes aux cellules immunitaires adaptatives et en régulant de nombreux processus cellulaires via la production de nombreux médiateurs solubles. Cette diversité de propriétés explique leur contribution dans de nombreux processus physiologiques (inflammation, défense antimicrobienne et antitumorale, réparation tissulaire).

1. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des macrophages repose sur la phagocytose, la production de médiateurs antimicrobiens et, indirectement, la présentation des antigènes aux cellules T.

La phagocytose, définie comme l'absorption cellulaire de particules, est l'une des fonctions fondamentales des macrophages. C'est un processus complexe participant aux défenses antimicrobiennes et se déroulant en plusieurs étapes. Le macrophage reconnaît la particule à ingérer grâce à des récepteurs de surface et va l'englober par la formation de pseudopodes. Le phagosome va ensuite fusionner avec des lysosomes pour former un phagolysosome dans lequel sont déversés des molécules antimicrobiennes. Cette fusion s'accompagne d'une activation du métabolisme de l'oxygène via la NADPH oxydase et une production de ROS et d'oxyde nitrique (NO) qui participent à la destruction des microbes. Une augmentation de l'expression et de l'assemblage de la NADPH est observée au niveau des phagosomes des macrophages qui catalyse la formation du superoxyde (O_2^-).

Les macrophages produisent également des peptides antimicrobiens (cathélicidines, défensine,) et des cytokines inflammatoires (IFN- γ) (Flannagan et al., 2015). De plus, les macrophages sont capables de présenter des antigènes microbiens via les molécules des CMH-I et CMH-II aux cellules T mémoires qui participeront au processus d'élimination des microbes.

La reconnaissance peut être directe (médiée par les PRR membranaires) ou indirecte après opsonisation des particules à ingérer et recouvertes d'immunoglobulines, de facteurs du complément ou de PRR solubles.

2. Efférocytose

L'efférocytose définit le processus d'élimination des cellules sénescents, apoptotiques et nécrotiques. Ce processus est donc essentiel dans le maintien de l'homéostasie et s'accompagne de la production de médiateurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β) impliqués notamment dans le maintien de la tolérance périphérique.

L'efferocytose est un mécanisme finement régulé reposant sur la libération par les cellules mortes de médiateurs solubles appelés « *find me molecules* », tels que la lysophosphatidylcholine (LPC), la sphingosine-1-phosphate (S1P), des nucléotides triphosphates (ATP/UTP) et la chimiokine CX3CL1, et qui sont responsables de l'attraction des macrophages. Elles expriment également à leur surface de signaux « *eat me molecules* » qui permettent aux macrophages de les distinguer des cellules vivantes (qui expriment des signaux « *don't eat me* »). La phosphatidylsérine (PS) est le principal motif « *eat-me* », reconnu par différents récepteurs tels que TIM1 et TIM4 (Elliott and Ravichandran, 2010; Boada-Romero et al., 2020).

L'interaction de CD47 avec la molécule SIRP α (*Signal Regulatory protein α*) génère est un signal « *don't eat me* » qui prévient la phagocytose des cellules vivantes (Matozaki et al., 2009). Il est intéressant de noter que les cellules cancéreuses expriment des niveaux élevés de CD47 afin d'échapper à la phagocytose par les macrophages (Takimoto et al., 2019).

3. Initiation et résolution de l'inflammation

L'inflammation est une réaction en réponse à un stress ou une lésion. Les macrophages sont impliqués à toutes les étapes de la réponse inflammatoire, de son initiation à sa résolution.

Les étapes initiales de la réponse inflammatoire reposent sur la production de médiateurs (cytokines, chimiokines) impliqués dans le recrutement des cellules immunitaires sur le site inflammatoire, processus qui s'accompagne d'une vasodilatation et d'une augmentation de la perméabilité de la paroi

vasculaire. Lorsque le starter de la réponse inflammatoire est éliminé, la phase de résolution permet de restaurer l'homéostasie tissulaire et, si nécessaire, initier la réparation du tissu lésé. Les macrophages régulent ainsi l'intensité et la durée de la réponse inflammatoire en diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires et en sécrétant des médiateurs anti-inflammatoires telles que les cytokines IL-10 et TGF- β .

4. Présentation des Ag/activation des LT

Outre leur rôle dans l'immunité innée, les macrophages sont également impliqués dans les réponses immunitaires adaptatives grâce à leur capacité de présentation antigénique aux lymphocytes T mémoires.

Les molécules du CMH-I présentent des peptides antigéniques dérivés de la protéolyse cytosolique aux cellules T CD8+ (Mantegazza et al., 2013) alors que les molécules du CMH-II présentent des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD4+ (Watts, 1997; Mantegazza et al., 2013). Les macrophages activés expriment des molécules de costimulation, telles que CD80 et CD86, nécessaires à l'activation des lymphocytes T mémoires.

5. Réparation tissulaire / homéostasie tissulaire

Le rôle des macrophages dans le processus de réparation tissulaire sera détaillé dans la partie III « Macrophages et cicatrisation ».

6. Fonctions des macrophages résidents/tissulaires

Les macrophages résidents (ou macrophages tissulaires) jouent de nombreux rôles physiologiques au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte. Ils peuvent porter des noms différents en fonction du tissu dans lequel ils résident : la microglie dans le système nerveux central (SNC), les macrophages alvéolaires dans les poumons, les cellules de Kupffer dans le foie, les ostéoclastes dans les tissus osseux et les cellules de Langerhans dans l'épiderme (Epelman et al., 2014) (Figure 5).

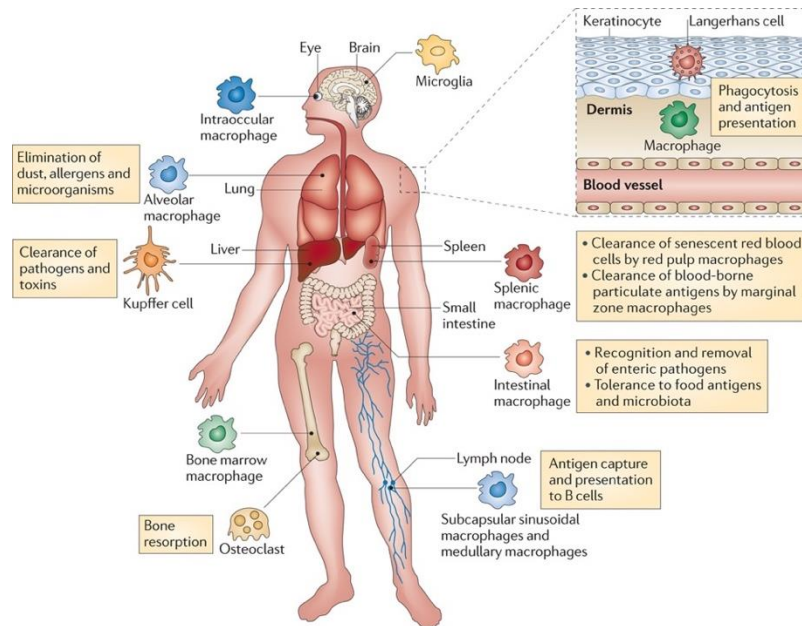


Figure 5. Différentes propriétés et localisation des sous-populations de macrophages tissulaires.
Figure issue de (Murray and Wynn, 2011).

Ces différents sous-types de macrophages possèdent des fonctions adaptées au tissu dans lequel ils résident. A titre d'exemple, les **cellules microgliales** sont impliquées dans la défense immunitaire et l'homéostasie du SNC (Colonna and Butovsky, 2017). En effet, ces cellules expriment des récepteurs pour les neurotransmetteurs impliqués dans le dialogue neurones-microglie. En condition physiologique, les cellules microgliales contribuent à la formation des circuits neuronaux, contrôlent l'état fonctionnel des synapses et éliminent les synapses redondantes. Lorsqu'elles détectent des agents pathogènes ou des lésions tissulaires, les cellules microgliales libèrent des cytokines pro-inflammatoires et des ROS afin d'éliminer les microbes et stimuler la régénération tissulaire. Cependant, en cas de dysfonctionnement, les cellules microgliales peuvent contribuer à des états de neuroinflammation et participer à des maladies neurodégénératives (Salter and Stevens, 2017).

Dans les alvéoles pulmonaires, les **macrophages alvéolaires** participent à l'élimination des microorganismes, des cellules mortes et des particules inhalées. Ils jouent un rôle crucial dans le maintien et la régulation du surfactant pulmonaire produit par les cellules épithéliales alvéolaires (Hussell and Bell, 2014).

Les macrophages du tissu osseux, appelés **ostéoclastes**, sont spécialisés dans la résorption osseuse. Les ostéoclastes matures sont générés à partir des monocytes en présence de la molécule RANKL. Ils sécrètent des protons et des enzymes protéolytiques impliqués dans la dégradation de la matrice osseuse (Boyle et al., 2003).

Dans le foie, les **cellules de Kupffer**, localisées à proximité de la paroi sinusoidale, jouent un rôle de sentinelle vis-à-vis des bactéries et débris bactériens transportés vers le foie par la veine porte. Elles participent ainsi au maintien des fonctions hépatiques, protègent le foie des infections bactériennes et assurent une fonction tolérogène via la production d'IL-10 et de prostaglandine E2 (PGE2). Les cellules de Kupffer participent également au métabolisme de nombreux métabolites, tels que le cholestérol, en régulant les taux plasmatiques des HDL et des VLDL, et sont impliquées dans le métabolisme du fer (Klein et al., 2007; Nguyen-Lefebvre and Horuzsko, 2015).

A l'origine identifiée comme des cellules dendritiques épidermiques, les **cellules de Langerhans** proviennent de la lignée des macrophages du progéniteur du foie fœtal adulte. Les cellules de Langerhans sont les principales CPA de l'épiderme (Otsuka et al., 2018).

7. Trained immunity

Contrairement au système immunitaire adaptatif, le système immunitaire inné ne présente pas de mémoire au sens donné aux réponses adaptatives. Cependant, des études ont montré que certaines cellules du système immunitaire inné, et en particulier les macrophages et les cellules NK, sont capables d'une « forme » de mémoire immunitaire ; ce processus, décrit en 2011, est appelé *Trained Immunity* (Netea et al., 2011). De manière schématique, cette mémoire immunitaire innée décrit le processus par lequel les cellules immunitaires innées présentent une réponse plus rapide et plus intense lors d'un second contact avec le même agent infectieux. Cette mémoire immunitaire innée est de courte durée (de trois mois à un an) (Netea et al., 2016). Ce processus a été mis en évidence lors de réponses à des agents immunostimulants, tels que le β -glucane et le vaccin BCG (Kleinnijenhuis et al., 2012; Arts et al., 2018).

La *trained immunity* est associée à une reprogrammation épigénétique et métabolique (Divangahi et al., 2021; Fanucchi et al., 2021). La reprogrammation épigénétique se traduit par une triméthylation de l'histone 3 sur la lysine 4 (H3K4me3) et une acétylation de l'histone 3 sur la lysine 27 (H3K27ac) qui favorisent l'expression des cytokines inflammatoires et donc la protection contre la réinfection. Lorsque le stimulus cesse, les modifications H3K27ac et H3K4me3 disparaissent mais la modification H3K4me1 persiste sur les promoteurs des gènes inflammatoires en l'absence de stimulus, constituant la base d'une réponse plus rapide et plus intense après re-stimulation (Saeed et al., 2014; Ochando et al., 2023).

Ce mécanisme est proposé pour de nouvelles approches vaccinales et stratégies thérapeutiques (traitement des états d'immunodéficience et modulation de l'inflammation dans les maladies auto-inflammatoires) (Municio and Criado, 2021).

8. Tolérance

La tolérance immunitaire des cellules immunitaires innées est le processus inverse à la *trained immunity* puisqu'elle induit une réponse moins intense en réponse à une deuxième stimulation. Ce mécanisme a initialement été décrit comme une réponse inflammatoire réduite après re-stimulation, avec une dose activatrice, de cellules initialement exposées à des doses faibles de ligands des TLR, comme décrit avec le LPS (Bauer et al., 2018). Comme pour la *trained immunity*, la tolérance innée est associée à des modifications épigénétiques qui induisent une accessibilité réduite de la chromatine et une inhibition de la liaison des facteurs de transcription sur les promoteurs des gènes codant pour les molécules inflammatoires (Hoeksema and de Winther, 2016; Chen et al., 2020). La première stimulation au LPS conduit à une triméthylation de H3K4 (H3K4me3) sur les promoteurs des gènes inflammatoires. Lorsque le stimulus est supprimé, la marque activatrice H3K4me3 est perdue et l'expression des gènes revient aux niveaux de base. Lors de la 2^{ème} stimulation au LPS, les gènes dits « tolérisés » ne retrouvent pas la marque H3K4me3 et restent donc silencieux (Foster et al., 2007). Les stratégies visant à améliorer ou réduire la tolérance ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques contre le cancer, les maladies inflammatoires et les complications métaboliques.

C. Polarisation des macrophages

1. Origine du concept de polarisation

Le terme de polarisation a été utilisé pour la première fois en 1986 par TR Mosmann pour décrire deux sous-populations de lymphocytes T auxiliaires murins, Th1 et Th2, sur la base de leurs profils cytokiniques (Mosmann et al., 1986). Cette classification a ensuite été adaptée aux macrophages pour décrire leur capacité à adopter des phénotypes différents en réponse à des stimuli.

Basée sur la dichotomie Th1/Th2, deux phénotypes principaux de macrophages ont été décrits : les macrophages dits classiquement activés, appelés M1, et les macrophages activés alternativement, appelés M2 (Mantovani et al., 2002) (Figure 6A). Cette classification est cependant simplificatrice et ne reflète que très imparfaitement la diversité des macrophages (Xu et al., 2013). En effet, il est

aujourd'hui admis qu'il existe une très grande variété de macrophages pouvant être représentée comme un continuum de sous-types fonctionnels dont les M1 et les M2 seraient les extrêmes. Cette classification a été affinée en 2004 avec la définition de 3 sous-classes de macrophages M2 (M2a, M2b et M2c) sur la base de leurs signatures transcriptomiques (Mantovani et al., 2004). Finalement, en 2008, une nouvelle classification, proposée par M Mosser, décrit trois populations de macrophages: les macrophages activés de manière classique, les macrophages réparateurs et les macrophages régulateurs (Mosser and Edwards, 2008) (Figure 6B).

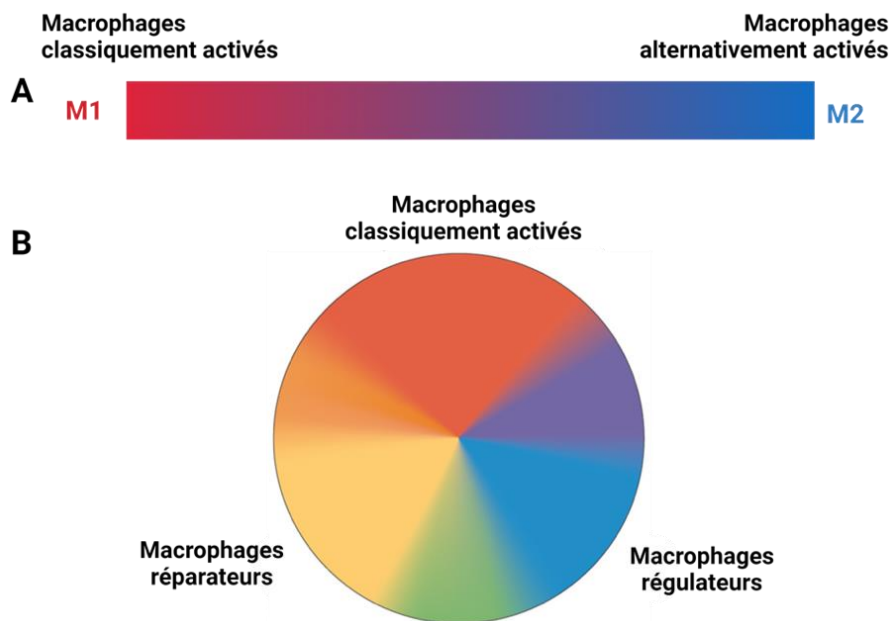


Figure 6. Représentation schématique de la classification des macrophages. **A.** Représentation monochromatique de la classification des macrophages sur la base de la dichotomie Th1/Th2 reposant sur une échelle linéaire ayant pour extrémités les macrophages M1 et M2. **B.** Roue chromatique représentant les trois populations de macrophages décrites par Mosser et Edwards, classées selon les trois couleurs primaires : le rouge désignant les macrophages activés classiquement, le bleu représentant les macrophages régulateurs et le jaune représentant les macrophages réparateurs. Figure adaptée de (Mosser and Edwards, 2008).

L'absence de consensus quant à la définition de l'activation des macrophages dans les expériences *in vitro* et *in vivo* entrave la progression de la recherche, notamment en raison de la persistance du concept M1 et M2 dans la littérature. Des études récentes ont définitivement montré que les macrophages possèdent un répertoire transcriptionnel extrêmement divers (Xue et al., 2014) qui ne correspondent pas être restreints à la dichotomie M1 versus M2. Ainsi, J Murray et al. ont proposé une nomenclature de l'activation des macrophages générés *in vitro* reposant sur l'utilisation des modes de stimulation pour nommer les sous-populations de macrophages étudiées (Murray et al., 2014).

2. Inducteurs et signatures des macrophages (phénotypique et cytokinique)

a) *Les macrophages de type 1 (M1)*

Les macrophages de type M1 sont générés à partir de précurseurs en présence d'IFN γ (produit par les cellules Th1 ou par les cellules NK et les macrophages), seul ou en présence de stimuli microbiens (LPS) ou d'autres cytokines inflammatoires (Mantovani et al., 2004; Mosser and Edwards, 2008) (Tableau 2). Ces macrophages sont caractérisés par la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-23, IL-6), des taux élevés d'IL-12 et faibles d'IL-10 (IL-12^{hi} IL-10^{lo}). Ils expriment également des niveaux élevés de CMH-II et des molécules de costimulation CD80 et CD86 et favorisent la génération de lymphocytes T auxiliaires Th1. Les macrophages de type M1 participent principalement à l'élimination des microbes par une production élevée de médiateurs microbicides tels que l'anion superoxyde (O₂⁻) et le peroxyde d'oxygène (H₂O₂) (Martinez et al., 2006; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Ils jouent également un rôle dans la défense antitumorale, notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires qui favorisent l'élimination des cellules tumorales et l'initiation d'une réponse immunitaire antitumorale.

Cependant, une activation excessive ou non contrôlée des macrophages de type M1 peut avoir des conséquences délétères, notamment lors des processus inflammatoires chroniques qui favorisent le développement et l'expansion des cellules Th17 pro-inflammatoires (Kolls and Lindén, 2004).

De récentes études ont révélé que la production de cytokines en réponse à des agents pathogènes est étroitement liée à des modifications du métabolisme cellulaire. Les macrophages M1 activés utilisent préférentiellement le glucose comme source énergétique via la voie de la glycolyse pour exercer leurs fonctions (Geeraerts et al., 2017). La glycolyse convertit le glucose en pyruvate qui, à son tour, est réduit en lactate via la lactate déshydrogénase (LDHA), conduisant ainsi à une augmentation des taux de lactate intracellulaire et extracellulaire. La glycolyse permet également l'utilisation de la voie des pentoses phosphates (PPP), impliquée dans la production de NO et de ROS à partir du NADH. Les macrophages M1 activent aussi les voies de synthèse des acides gras et de l'arginine, permettant la formation du NO.

Parallèlement à la glycolyse, les macrophages M1 ont un cycle de Krebs altéré : le cycle est rompu au niveau de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et de la succinate déshydrogénase (SDH), ce qui entraîne l'accumulation intracellulaire, respectivement, d'isocitrate et du succinate (Diskin and Pålsson-McDermott, 2018). Les modifications des taux de ces métabolites peuvent modifier l'activité des voies de signalisation. Le succinate accumulé stabilise la protéine HIF-1 α qui est le facteur de transcription

essentiel dans l'expression d'IL-1 β (Tannahill et al., 2013). De plus, la stabilisation de HIF-1 α peut être associée à une augmentation du flux glycolytique de par sa capacité à induire l'expression de gènes glycolytiques tels que le transporteur du glucose (GLUT1) et la LDHA (Freemerman et al., 2014). Le citrate, quant à lui, est utilisé pour la production d'acides gras, de NO/ROS ainsi que pour la synthèse de l'itaconate, qui à son tour limite l'activité de la SDH et donc les processus inflammatoires induits par le succinate.

Une étude a montré que les macrophages M1 humains générés en présence de GM-CSF présentent un niveau élevé de glycolyse associée à une expression élevée des enzymes glycolytiques et des métabolites liés à la glycolyse, et que l'utilisation d'inhibiteurs de la glycolyse inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Izquierdo et al., 2015). Le métabolisme des macrophages M1 est donc caractérisé par une glycolyse aérobie et un cycle de Krebs altéré, qui contribuent à leur phénotype pro-inflammatoire.

Sous-types de M ϕ	Inducteurs	Voies de signalisation	Marqueurs membranaires	Médiateurs sécrétés	Fonctions
M1	IFN γ + LPS ou TNF- α	NF- κ B, STAT1, STAT5, IRF3, IRF5, HIF1a	CD68, CD80, CD86, CMH-II, TLR2, TLR4	IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF- α , IL-10 ^{lo} , IL-12 ^{hi} , CCL5, CXCL9/10/11, ROS	Immunité antimicrobienne, anti-tumorale, inflammation et réponse de type Th1
M2a	IL-4, IL-13	STAT1, STAT3, STAT6, PPAR γ	CD206, CD163, IL-1R II, CMH-II	IL-10, IL-1Ra, CCL17, CCL18, CCL22, CCL24	Anti-parasitaire, réparation tissulaire, anti-inflammatoire
M2b	CI + TLR ou IL-1 agonistes	STAT1, STAT3, AP1	CD80, CD86, IL-10R, IL-12R, CMH-II	IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 ^{hi} , IL-12 ^{lo} , CCL1, CCL2, CCL5, CXCL8	Th2 activation, immunorégulation
M2c	IL-10, TGF- β , glucocorticoïdes	STAT3, NF- κ B	CD163, CD16, SR, TLR-1, TLR-8	IL-10, TGF- β , VEGF, CCL16, CCL18, CXCL13, MMPs	Immunorégulation, remodelage tissulaire et de la matrice extracellulaire

Tableau 2. Classification des sous-types de macrophages. La nature des stimuli impliqués dans la génération, les marqueurs spécifiques et les fonctions biologiques des macrophages M1 et M2 sont présentés.

b) Les macrophages de type 2 (M2)

La génération des macrophages M2 a été initialement associée à une réponse de type Th2 (Tableau 2):

- les macrophages M2a sont générés en réponse à l'IL-4 ou l'IL-13,
- les macrophages M2b sont induits par les complexes immuns, des agonistes de certains TLR ou récepteurs à l'IL-1,
- les macrophages M2c sont principalement induits par les glucocorticoïdes, l'IL-10 et le TGF- β .

Les macrophages M2 expriment des marqueurs de surface spécifiques tels que CD163, CD206, CD209 (DC-SIGN), et CD36 et sont caractérisés par un profil IL-10^{hi} IL-12^{lo}. Les macrophages M2 sont impliqués dans (Mantovani et al., 2004) :

- la résolution de l'inflammation, notamment via la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β),
- la promotion de la réparation et du remodelage tissulaire via la production de facteurs de croissance et angiogéniques ainsi que d'enzymes protéolytiques,
- la progression tumorale.

Les **macrophages M2a** sont caractérisés par l'expression du récepteur au mannose CD206 et du SR CD163. Ils présentent un phénotype anti-inflammatoire caractérisé par la sécrétion de médiateurs immunosuppresseurs et anti-inflammatoires, tels que l'IL-10 et l'IL-1Ra (*Interleukin-1 receptor antagonist*) ainsi que des chimiokines CCL17, CCL18, CCL22 et CCL24 qui favorisent la prolifération cellulaire, la réparation tissulaire et l'endocytose. Ils sont impliqués dans la réponse de type Th2.

Les **macrophages M2b** sont impliqués dans l'immunorégulation.

Les **macrophages M2c** se caractérisent par des niveaux élevés des médiateurs IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18 et CXCL13. Ils sont impliqués dans la phagocytose des cellules apoptotiques et dans le remodelage de la matrice extracellulaire.

Alors que les macrophages M1 privilégient la glycolyse pour produire de l'énergie, les macrophages M2 produisent de l'ATP principalement via le cycle oxydatif du cycle de Krebs couplé à la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) (Pearce and Pearce, 2013; Gonzalez-Hurtado et al., 2017). Afin d'alimenter le cycle de Krebs, les macrophages M2 s'appuient sur deux sources métaboliques : l'oxydation des acides gras (*Fatty acid oxidation* ou FAO) et le métabolisme de la glutamine. La FAO fournit de l'acétyl-CoA à un cycle de Krebs fonctionnel. Le NADH dérivé du cycle de Krebs est ensuite utilisé par la chaîne de transport d'électrons (*Electron Transport Chain* ou ETC) afin de produire de l'ATP via l'ATP synthase (Wculek et al., 2022). De plus, les macrophages M2 présente une diminution d'activité des voies de la glycolyse et des pentoses phosphates. L'IL-4 induit l'oxydation des acides gras et la biogénèse mitochondriale via l'activation de STAT6 et PGC-1 β (coactivateur de PPAR γ -1 β). De plus, l'inhibition de PGC-1 β altère la polarisation des macrophages M2 consécutive à une diminution de la FAO (Vats et al., 2006). Cependant, une étude a montré que l'inhibition du transporteur mitochondrial des acides gras CPT1 n'inhibe pas l'acquisition des marqueurs de type M2. D'autres voies pourraient être impliquées dans la polarisation des macrophages M2 indépendamment de CPT1 (Divakaruni et al., 2018).

De plus, en favorisant le métabolisme de la glutamine, l'IL-4 peut alimenter le cycle de Krebs via la génération d' α -cétoglutarate (α -KG). L' α -KG, produit par la glutaminolyse, est essentiel pour l'activité des voies OXPHOS et FAO. α -KG joue également un rôle épigénétique en induisant la déméthylation du résidu H3K27 sur les promoteurs des gènes marqueurs M2 et donc favorise leur expression (Liu et al., 2017).

Au fil des années, certains métabolites ont été identifiés comme jouant un rôle dans la régulation de la polarisation des macrophages M2. Des études ont montré que le lactate favorise la polarisation des macrophages vers un profil M2, notamment en induisant l'expression de gènes de type M2 tels que VEGF, Arg1 et IL-10 (Colegio et al., 2014; Sella et al., 2016). De plus, il a été rapporté que le lactate confère aux macrophages humains un phénotype combinant des caractéristiques de type M2 et inflammatoire (Paolini et al., 2020).

Il est important de noter que le phénotype des macrophages n'est pas figé et qu'il évolue en permanence en fonction des signaux qu'ils reçoivent, localement. Communément appelée plasticité, cette capacité d'adaptation, dynamique et réversible, permet aux macrophages de s'adapter aux besoins du tissu.

3. Modifications épigénétiques associées à la polarisation des macrophages

De nombreuses études ont démontré l'importance de l'épigénétique dans la régulation de la différenciation, l'activation et la polarisation des macrophages (Van den Bossche et al., 2014). De plus, les interactions entre métabolisme et épigénétique émergent comme des acteurs majeurs de la polarisation des macrophages (Noe et al., 2021 ; Baardman et al., 2015).

Les marques épigénétiques contrôlent l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN et peuvent être régulées en réponse aux facteurs environnementaux. Parmi les marques épigénétiques, il a été montré que la méthylation de l'ADN ainsi que la méthylation et l'acétylation des histones influencent le phénotype des macrophages. Les régulations épigénétiques décrites dans la littérature comme étant impliquées dans la régulation du phénotype des macrophages sont résumées dans la Figure 7 (Davis and Gallagher, 2019). Ces modifications épigénétiques modifient l'expression des gènes en régulant la compaction de la chromatine : passant d'une hétérochromatine (dense et inaccessible) à une euchromatine (décondensée et accessible aux facteurs de transcription). La méthylation de l'ADN est décrite comme favorisant l'inactivation des gènes alors que les modifications des histones peuvent marquer un état ouvert ou fermé de la chromatine.

L'acétyl-CoA agit comme une molécule donneuse d'acétyle aux résidus lysine (K). L'état d'acétylation des histones est contrôlé par des histones acétyltransférases (HAT). L'acétylation des histones H3K9, H3K14 et H3K27 est associée à une activité transcriptionnelle. Au contraire, les histones désacétylases (HDAC) catalysent la perte du groupement acétyle ce qui entraîne la répression de la transcription des gènes. Les HDAC sont regroupés en quatre classes : HDAC de classe I (HDAC 1,2,3 et 8), HDAC de classe II (HDAC 4,5,6,7, 9 et 10), HDAC de classe III (Sirtuines ou SIRT 1 à 7) et HDAC de classe IV (HDAC11) (Figure 7).

Concernant la régulation de l'expression des gènes par méthylation des histones, elle peut être associée soit à une activation, soit à une répression transcriptionnelle, en fonction des sites de méthylation et du nombre de méthyles sur les résidus lysine. En effet, la diméthylation (-me₂) ou la triméthylation (-me₃) de l'histone 3 au niveau des résidus lysine 4 (H3K4), H3K36 et H3K79 sont associées à l'activation de la transcription alors que modifications H3K9me_{2/3} et H3K27me_{2/3} sont associées à la répression de la transcription. La méthylation des histones est régulée par des histones méthyltransférases (HMT) et des histones déméthylases (HDM) (Figure 7). Plusieurs enzymes contrôlant la méthylation et l'acétylation des histones ont été identifiées, parmi lesquelles deux enzymes principalement étudiées ces dernières années : l'histone désacétylase HDAC3 et l'histone déméthylase Jmjd3 (Figure 7).

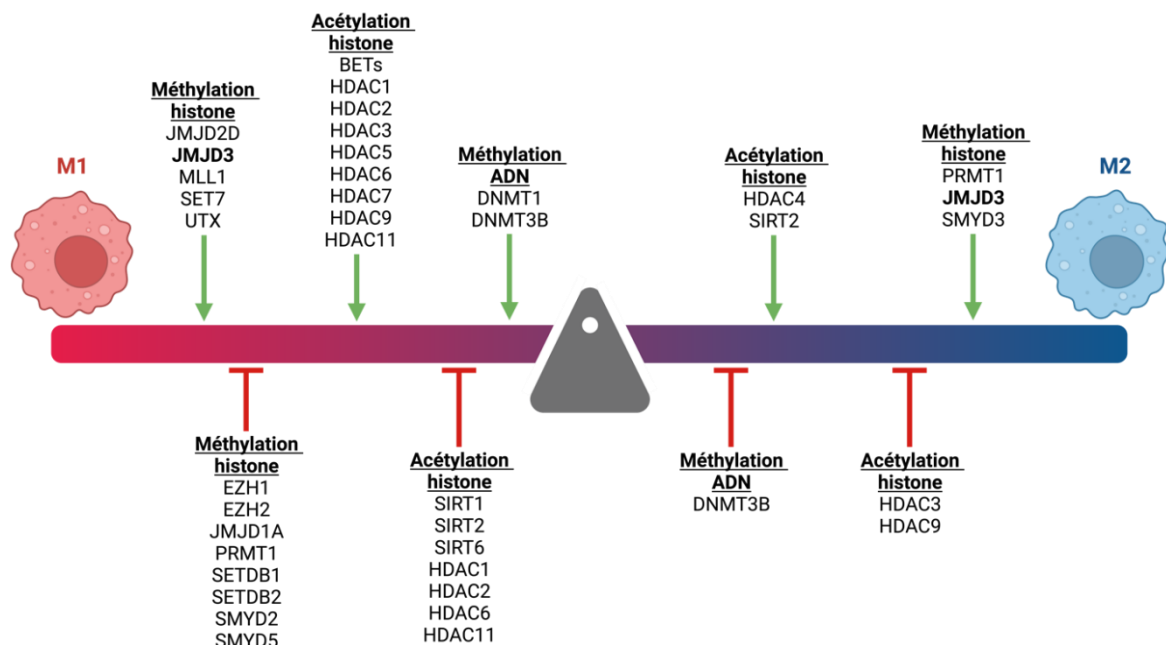


Figure 7. Les modifications épigénétiques régulant la polarisation des macrophages. Figure adaptée de (Davis and Gallagher, 2019).

L'histone désacétylase 3 (HDAC3) est une enzyme clé de la polarisation des macrophages M1 qui freine la génération des macrophages M2 (Mullican et al., 2011; Chen et al., 2012). HDAC3 régule l'expression des gènes pro-inflammatoires des macrophages en réponse au LPS (Chen et al., 2012). De plus, la désacétylation des histones induite par HDAC3 conduit à la répression de nombreux gènes contrôlés par l'IL-4 (tels que Arg1, Retnla et Chi3l3). L'inhibition de HDAC3 dans les macrophages réduit la production de cytokines inflammatoires et améliore l'activation alternative des macrophages (Hoeksema et al., 2014; Sanchez et al., 2018).

Jmjd3, également appelée KDM6B, est une déméthylase impliquée dans la déméthylation de l'histone H3K27 et dont l'activité est associée à la polarisation des macrophages. Jmjd3 peut être induite par des ligands de TLR, tels que le LPS (De Santa et al., 2007, 2009) : l'inhibition de Jmjd3 dans des macrophages activés présente une production diminuée des cytokines inflammatoires (Kruidenier et al., 2012). Jmjd3 peut également être induite par l'IL-4, et donc participer à la polarisation des macrophages M2 murins en réponse à une infection parasitaire aux helminthes via IRF4, un médiateur de la polarisation des macrophages M2 (Sato et al., 2010). De plus, Ishii et al. ont montré que les macrophages traités à l'IL-4 présentent une diminution de la méthylation de H3K27 au niveau des promoteurs des gènes M2 avec une augmentation concomitante de l'expression de Jmjd3. Cette expression de Jmjd3 est médiée par STAT6, facteur de transcription impliqué dans la signalisation via le récepteur à l'IL-4 (Ishii et al., 2009).

4. Différences entre macrophages humains et murins

Il existe des différences significatives entre les macrophages des deux espèces, qu'elles soient phénotypiques, métaboliques ou fonctionnelles, ce qui rend difficile de transposer les résultats d'une espèce à l'autre et a pu entraîner des erreurs sur leur biologie (Figure 8).

L'origine et la génération des macrophages utilisés dans les études diffèrent entre les deux espèces. Ainsi, les macrophages humains sont généralement générés *in vitro* à partir des monocytes circulants alors que les macrophages murins sont générés à partir des progéniteurs hématopoïétiques. Chez l'homme, le M-CSF et le GM-CSF favorisent la survie et la différenciation des monocytes en macrophages alors que, chez la souris, le GM-CSF induit la différenciation des précurseurs myéloïdes en DC matures et macrophages (Helft et al., 2015). De plus, les facteurs de polarisation diffèrent entre l'homme et la souris. A titre d'exemple, le LPS induit la génération de macrophages murins avec un profil inflammatoire alors qu'il est utilisé pour révéler le phénotype des macrophages humains, quel que soit leur sous-type (Figure 8A).

D'un point de vue phénotypique, la polarisation des macrophages humains est définie principalement par leur phénotype sécrétoire tandis que les macrophages murins peuvent être caractérisés sans ambiguïté par leur phénotype membranaire. Les macrophages M1 humains sont caractérisés par une expression élevée des marqueurs membranaires CD80 et CD86 et par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'IL-12. En revanche, les macrophages M1 murins expriment les marqueurs CD11c, CD11b et CD38 et produisent du NO en plus des cytokines inflammatoires. Concernant les macrophages de type M2, ils sont caractérisés, chez l'homme, par une expression élevée de CD163 et CD206 et par la production d'IL-10 et de facteurs de croissance, alors qu'ils sont définis chez la souris par l'expression d'arginase 1 (*Arg1*), de *Ym1* et de *Fizz1* (*Found in inflammatory zone 1*). La signature la plus utilisée est l'expression des enzymes NO synthase inductible (iNOS) pour les macrophages M1 murins et *Arg1* pour les macrophages M2 murins, deux molécules non exprimées par les macrophages humains (Raes et al., 2005). De plus, le marqueur macrophagique F4/80 n'a pas d'homologue humain et les facteurs de transcription impliqués dans la polarisation des macrophages M1 et M2 diffèrent entre les deux espèces (Figure 8B). Enfin, si la prolifération des macrophages murins est largement décrite (Hashimoto et al., 2013; Wang et al., 2021), celle des macrophages humains reste débattue (Yang et al., 1998).

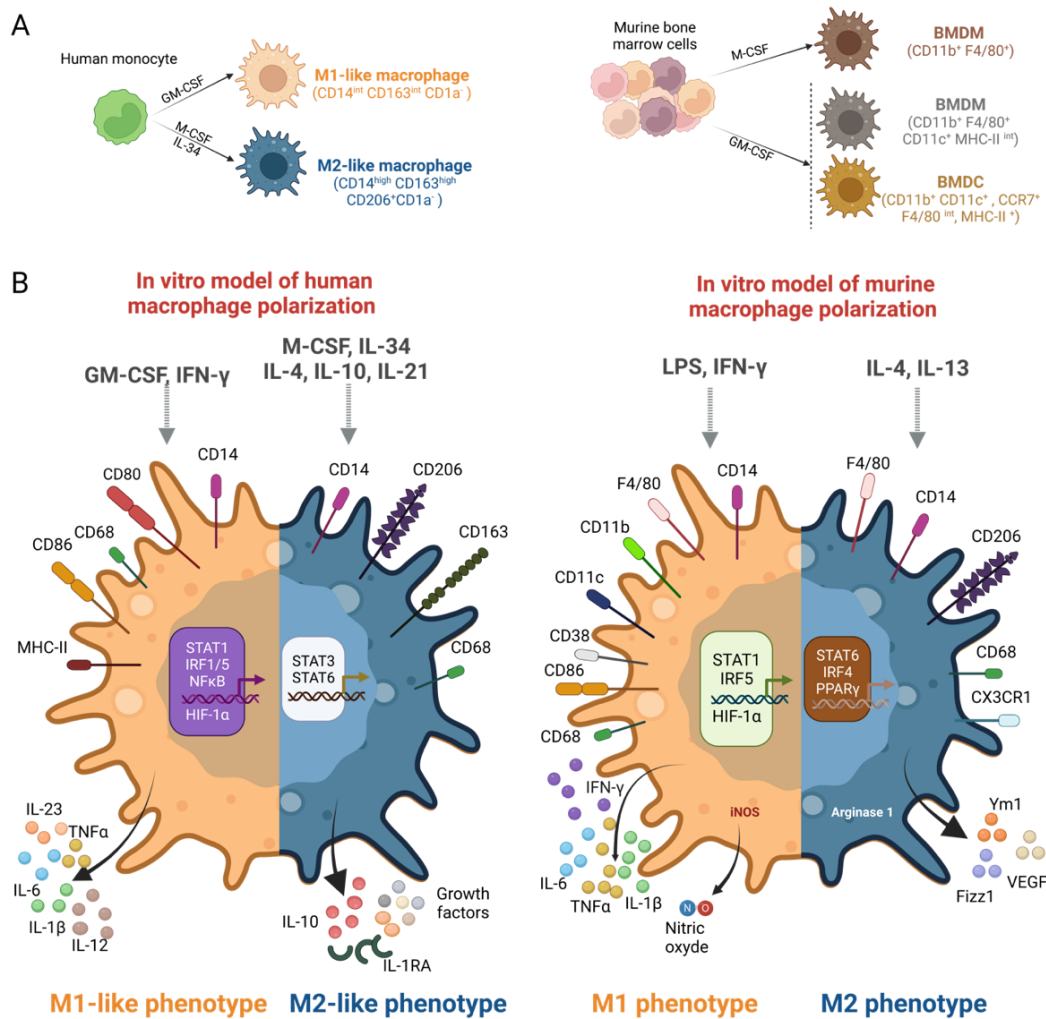


Figure 8. Différences dans la génération et la polarisation des macrophages humains et murins. A. Panel de gauche, les macrophages humains sont généralement générés *in vitro* à partir de monocytes du sang périphérique cultivés en présence de facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) (en présence ou en absence d'IFN γ) ou de facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF) / IL-34 (en présence ou en absence d'IL-4) pour générer des cellules M1 et M2, respectivement. Pour révéler leur phénotype, les macrophages humains doivent être activés. Panel de droite : Les macrophages murins sont principalement générés à partir de progéniteurs de cellules myéloïdes de la moelle osseuse maintenus dans le M-CSF. L'utilisation du GM-CSF permet de générer à la fois des cellules dendritiques et des macrophages. **B.** Panel de gauche : les marqueurs humains de la polarisation des macrophages sont représentés. Panel de droite : marqueurs murins de la polarisation des macrophages. BMDC, bone-marrow derived dendritic cells; BMDM, bone-marrow derived macrophages; GM-CSF, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; HIF-1 α , hypoxia inducible factor; IFN- γ , Interferon-gamma; IRF, Interferon regulatory factor; LPS, lipopolysaccharide; M-CSF, Macrophage colony-stimulating factor MHC-II, major histocompatibility complex class II; STAT, Signal transducer and activator of transcription. Figure tirée de (Monnier et al., 2022).

D. Rôles physiopathologiques des macrophages

Le phénotype fonctionnel des macrophages peut être profondément modifié en situation pathologique. Ils peuvent alors se comporter comme des acteurs favorisant la pathologie, notamment en condition chronique, comme cela est observé dans des maladies sévères telles que le cancer et les maladies inflammatoires chroniques. De par leur implication dans de nombreuses pathologies, les macrophages sont devenus des cibles thérapeutiques pertinentes (Wynn et al., 2013).

1. Cancer

Les macrophages représentent les cellules immunitaires les plus abondantes dans la majorité des tumeurs solides et leur infiltrat est généralement associé à un mauvais pronostic (Gentles et al., 2015; Sinha et al., 2021). Les macrophages associés aux tumeurs (*Tumor-Associated Macrophages* ou TAM) sont un élément clé du microenvironnement tumoral (*Tumor Microenvironment* ou TME) de par leur capacité à influencer la progression de la tumeur en atténuant l'activité antitumorale et en induisant des fonctions de soutien à la tumeur. Les TAMs peuvent avoir différentes origines en fonction de la localisation de la tumeur, dérivant soit des macrophages tissulaires résidents, soit des monocytes recrutés (Loyher et al., 2018; Casanova-Acebes et al., 2021). Il a ainsi été montré, dans un modèle murin de cancer du poumon, que les TAMs sont initialement composés de macrophages résidents qui acquièrent des fonctions protumorales et prolifèrent et qu'ils dérivent principalement de monocytes lors des phases plus tardives du développement tumoral, (Casanova-Acebes et al., 2021).

Le recrutement des monocytes est induit par des chimiokines (telles que CCL2 et CCL5), le M-CSF et les membres de la famille du VEGF produits par les cellules cancéreuses et les cellules stromales du TME. Les macrophages ont un double rôle dans le cancer, exerçant une activité pro ou antitumorale en fonction de l'équilibre des signaux présent dans le TME (Locati et al., 2020; Mantovani et al., 2022). Les macrophages sont capables de tuer les cellules tumorales, de favoriser l'activité des cellules tueuses, de provoquer des lésions vasculaires et une nécrose tumorale, et de contrôler la prolifération des cellules tumorales en coopération avec les lymphocytes T. En revanche, dans la majorité des tumeurs établies, les TAMs contribuent à la progression de la tumeur. Ils favorisent la croissance tumorale, les métastases, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse ainsi que l'inflammation associée à la tumeur via la sécrétion de cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-10, TNF α), de facteurs de croissance (EGF, VEGF et PDGF) et de protéines de remodelage tissulaire (telles que les MMP). De plus, les TAMs contribuent à l'immunosuppression en favorisant le recrutement et la génération de lymphocytes T régulateurs (Treg) par la sécrétion d'IL-10, l'inactivation des lymphocytes T effecteurs en exprimant des molécules

co-inhibitrices telles que PDL-1 et PDL-2 et l'inhibition de la maturation des DC (Figure 9) (Mantovani et al., 2017). Les TAMs peuvent également limiter l'activité antitumorale en induisant une chimiorésistance des cellules tumorales contre certaines chimiothérapies (Halbrook et al., 2019).

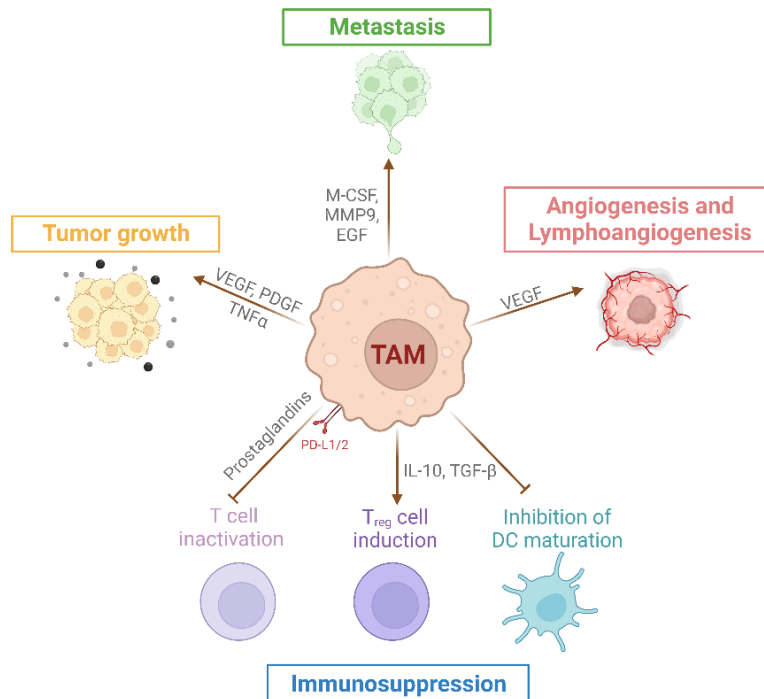


Figure 9. Rôles protumoraux des macrophages associés aux tumeurs (TAM). Les TAM sécrètent des facteurs dans le microenvironnement tumoral et expriment des molécules qui favorisent la tumorigenèse en favorisant la prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse/lymphoangiogenèse, les métastases et l'immunosuppression. Les TAMs peuvent également favoriser l'immunosuppression en induisant des cellules Treg, inactivant les cellules cytotoxiques et inhibant la maturation des cellules dendritiques (DC). EGF, epithelial growth factor; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MMP, matrix metalloprotease; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. Figure tirée de (Monnier et al., 2022).

Différentes stratégies ciblant les TAMs sont régulièrement évaluées lors d'essais cliniques, seules ou en association avec une radiothérapie, une chimiothérapie ou une immunothérapie (Anfray et al., 2019; Kowal et al., 2019). Parmi ces stratégies, on retrouve des thérapies empêchant le recrutement et/ou la survie des TAMs, notamment par l'inhibition des axes M-CSF/CD115 ou CCL2/CCR2, ou favorisant la reprogrammation vers un phénotype antitumoral (Jalil et al., 2020; Zhang et al., 2020b; Mantovani et al., 2022). Cependant, alors que les modèles murins donnent des résultats encourageants, les essais cliniques ont donné lieu à des résultats plus mitigés. Cette discordance peut être expliquée, au moins en partie, par les différences entre les macrophages humains et murins (Monnier et al., 2022). La neutralisation de l'axe M-CSF/CD115 amplifie l'impact du GM-CSF sur les cellules myéloïdes dans un modèle murin. Cependant, le GM-CSF a des effets différents sur la

différenciation des cellules myéloïdes entre les deux espèces : il induit la différenciation des précurseurs myéloïdes murins en DC et favorise la réponse antitumorale en facilitant leur recrutement et activation (Yan et al., 2017; Jeannin et al., 2018). Cependant, le M-CSF et le GM-CSF favorisent la survie des monocytes et la différenciation des macrophages humains (Figure 8). Comme mentionné précédemment, il existe des différences phénotypiques entre les macrophages humains et murins qui pourraient avoir un impact dans la réponse antitumorale. L'IFN- γ est décrit comme facilitant la génération et l'activation de lymphocytes Th1, initiant une réponse lymphocytaire cytotoxique et reprogrammant les TAMs en macrophages antitumoraux. Cependant, les macrophages et les TAMs humains générés *in vitro* expriment peu d'IFN- γ comparativement aux cellules murines.

2. Maladies inflammatoires chroniques

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance des macrophages dans des maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, l'obésité ou encore le diabète, de par leurs capacités inflammatoires et de remodelage délétères (Wynn et al., 2013; Parisi et al., 2018; Ponzoni et al., 2018).

L'asthme est une maladie des voies respiratoires, potentiellement chronique, caractérisée par une hypersensibilité bronchique, une inflammation et une obstruction des voies respiratoires (Habib et al., 2022; Wang et al., 2023). Les macrophages alvéolaires des sujets asthmatiques présentent un défaut de phagocytose pouvant favoriser une colonisation bactérienne des voies respiratoires par différents pathogènes, tels que *Staphylococcus aureus* ou *Haemophilus influenza*, conduisant à une dysbiose (Liang et al., 2014; Simpson et al., 2016). Ces macrophages présentent également un défaut d'efferocytose induisant une accumulation de cellules mortes et de DAMPs (Watanabe et al., 2011). De plus, au cours de l'inflammation, et associée à une diminution de la sécrétion d'IL-10 (Lim et al., 2004), les macrophages libèrent des niveaux élevés de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α et CCL-17 qui contribuent à l'inflammation chronique et à son exacerbation (van der Veen et al., 2020).

La **polyarthrite rhumatoïde (PR)** est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique de la membrane synoviale (synovite), une destruction des articulations et l'érosion des os (Smolen et al., 2018). Les monocytes et macrophages jouent un rôle clé dans la physiopathologie de la PR via la production de cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α) qui favorisent le processus de destruction du cartilage et de perte osseuse (Udalova et al., 2016; Siouti and Andreakos, 2019). Les

macrophages sécrètent également des chimiokines (telles que CCL2, CCL5 et CXCL8) favorisant le recrutement de monocytes et de neutrophiles dans le tissu inflammé. De plus, le TNF et l'IL-1 β produits par les macrophages favorisent la prolifération des fibroblastes qui sécrètent RANKL et M-CSF, favorisant la différenciation des monocytes en ostéoclastes (Takayanagi et al., 2000) qui, une fois activés, vont dégrader la matrice osseuse.

Plusieurs études ont démontré un lien entre PR et risque cardiovasculaire consécutif à une accélération de l'athérosclérose induite par l'inflammation chronique (Houry Levi et al., 2016; Błyszczuk and Szekanecz, 2020). Dans ces deux pathologies, les macrophages présentent un statut métabolique similaire, caractérisé par une augmentation de l'activité mitochondriale et une production accrue d'ATP résultant d'une plus importante activité glycolytique (Zeisbrich et al., 2018).

L'**athérosclérose** est une maladie inflammatoire chronique qui résulte d'un déséquilibre du métabolisme lipidique entraînant la rétention de lipoprotéines dans les parois artérielles et la formation de plaques d'athérome à l'origine d'un rétrécissement du diamètre artériel. Les macrophages sont impliqués dans la progression de l'athérosclérose par leurs propriétés inflammatoires et leur capacité à favoriser la thrombose et la formation de la plaque d'athérome (Moore and Tabas, 2011). L'athérosclérose débute par la formation de plaques d'athérome consécutive à des dommages de la paroi artérielle associés à l'accumulation sous-endothéliale de lipoprotéines. Les macrophages ingèrent les lipoprotéines accumulées dans les parois vasculaires et se transforment en « cellules spumeuses » (*foam cells*) qui contribuent au stockage des lipides de la plaque et à sa croissance (Moore et al., 2013; Bobryshev et al., 2016). Les macrophages spumeux ont une capacité de migration réduite et présentent un phénotype inflammatoire. La dérégulation du métabolisme lipidique de ces macrophages conduit à une augmentation de leur mort qui, combinée à une efferocytose défectueuse, entraîne la libération de leur contenu lipidique et la formation d'un noyau nécrotique (Tabas, 2005). Ce noyau nécrotique joue un rôle clé dans la formation de caillots sanguins intravasculaires et de plaques instables qui peuvent être à l'origine des infarctus du myocarde et des accidents vasculaires cérébraux.

Les macrophages jouent également un rôle essentiel dans l'**obésité**, notamment via leur capacité à sécréter des médiateurs inflammatoires. L'obésité est souvent associée à une inflammation chronique de bas grade caractérisée par une accumulation de macrophages dans les tissus adipeux. Cette inflammation contribue à l'insulinorésistance, mécanisme central du diabète de type 2. Les macrophages activés dans les tissus adipeux peuvent contribuer à la formation de plaques d'athérome, à une stéatose hépatique et à la dysfonction pancréatique, dérégulations couramment associées au diabète de type 2.

III. Macrophages et cicatrisation

A. Généralités sur le processus de réparation tissulaire et la cicatrisation cutanée

La réparation tissulaire est un processus dynamique et coordonné qui vise à restaurer la structure et la fonction des tissus suite à une lésion, quelle que soit son origine. Ce processus est schématiquement organisé en trois phases successives et interconnectées : (1) hémostase-inflammation, (2) prolifération cellulaire et re-épithélialisation et (3) remodelage tissulaire (Figure 10) (Martin, 1997; Minutti and Knipper, 2017; Kumar et al., 2020). La cinétique de chaque phase est dépendante de la sévérité de la lésion ainsi que de facteurs externes ou endogènes (tels que l'âge, les pathologies ou une infection). J'illustre ici le processus de réparation tissulaire dans un contexte de plaie cutanée.

(1) La première étape de la réparation tissulaire débute immédiatement après la lésion et vise à stopper l'hémorragie. L'hémostase permet la fermeture de la plaie et se caractérise par l'activation de la cascade de coagulation et une vasoconstriction afin de réduire le flux sanguin. En parallèle, un caillot sanguin se forme afin de fermer provisoirement la plaie (arrêt du saignement, formation d'un bouclier de protection contre les microbes). Ce caillot résulte de l'agrégation plaquettaire qui forme, dans un premier temps, un clou plaquettaire. Le clou plaquettaire est ensuite englobé, avec les cellules sanguines, par un réseau composé majoritairement de fibrine mais également de protéines de soutien (fibronectine, vitronectine, thrombospondines) créant ainsi le caillot sanguin. Une fois le saignement terminé, les cellules immunitaires vont infiltrer la zone lésée, étape qui signe la transition vers la phase inflammatoire. Les macrophages résidents dans le derme sont activés par les DAMPs libérés par les cellules endommagées et par les PAMPs si présence de microbes. Les macrophages activés vont libérer des cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IFN- γ), des chimiokines (telles que CXCL5, CXCL8 et CCL2) et des facteurs de croissance (tels que PDGF et TGF- β) qui vont amplifier le recrutement de monocytes et de neutrophiles. Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées et les plus abondantes au stade précoce de l'inflammation ; ils préviennent les infections et participent à l'élimination des débris cellulaires (Wilgus et al., 2013). Les monocytes recrutés se polarisent ensuite en macrophages pro-inflammatoires sous l'action des signaux présents dans le microenvironnement de la lésion. A ce stade, le tissu lésé présente toutes les caractéristiques de l'inflammation (érythème, œdème, douleur, chaleur.).

(2) La phase de prolifération consiste en la reconstruction du tissu endommagé. Elle débute environ trois jours après la lésion et peut durer jusqu'à quinze jours voire plus selon la gravité. Cette phase est

caractérisée par la prolifération, la différenciation cellulaire et la création d'une nouvelle matrice extracellulaire (MEC), impliquant un processus complexe d'interactions cellules-cellules et cellules-MEC. Les cellules clés de cette phase sont les fibroblastes. Ils se différencient en myofibroblastes qui, par contraction, vont réduire la taille de la lésion (rapprochement des bords de la plaie). De plus, les fibroblastes et les myofibroblastes sont capables de synthétiser des protéines de la MEC. Le collagène synthétisé lors de la phase de prolifération est principalement du collagène de type III (plus souple et moins résistant que le collagène de type I). Les cellules endothéliales vont proliférer durant cette phase afin de former de nouveaux vaisseaux sanguins pour fournir des nutriments et de l'oxygène au tissu néoformé. La prolifération des fibroblastes, l'angiogenèse et la présence de macrophages forment un tissu dit « de granulation » (aspect granulaire) et caractérisé par une importante vascularisation. Les cellules épithéliales participent également au processus de cicatrisation en migrant et proliférant afin de recouvrir la surface de la plaie et rétablir la barrière cutanée (re-épithélialisation).

(3) La phase de remodelage est la dernière étape du processus de cicatrisation et se produit deux à trois semaines après la lésion et peut durer plusieurs mois. Cette étape permet de renforcer et de remodeler le tissu cicatriciel et se caractérise par le remodelage du collagène. Ainsi, sous l'influence des fibroblastes et des myofibroblastes, le collagène « cicatriciel » est progressivement remplacé par du collagène de type I dont la réticulation permet de réduire l'épaisseur de la cicatrice et de consolider la zone réparée. L'équilibre entre synthèse et dégradation du collagène est crucial afin d'obtenir une cicatrice normale. Les cellules inflammatoires sont progressivement éliminées (par apoptose) et les l'architecture vasculaire néoformée se réorganise pour stabiliser le tissu cicatriciel. La contraction du tissu cicatriciel est assurée par les myofibroblastes permettant, à la fin du processus de cicatrisation, d'assurer une forte résistance à la traction.

B. Rôles des macrophages dans chacune des étapes du processus de réparation tissulaire

Comme mentionné précédemment, la cicatrisation des plaies est un processus complexe qui nécessite la coopération entre de nombreux partenaires cellulaires et moléculaires, et en particulier des macrophages. Ils sont présents à toutes les étapes du processus et leur fonction évolue au cours de la cicatrisation (Minutti and Knipper, 2017) en contribuant à la régulation de la réponse inflammatoire, à l'élimination des débris cellulaires, à la stimulation de la prolifération cellulaire et au remodelage tissulaire (Figure 10). La déplétion des macrophages au cours des trois phases impacte profondément

le processus de cicatrisation ; plus la déplétion est précoce, plus la cicatrisation est abrogée/impactée (Leibovich and Ross, 1975; Mirza et al., 2009; Lucas et al., 2010).

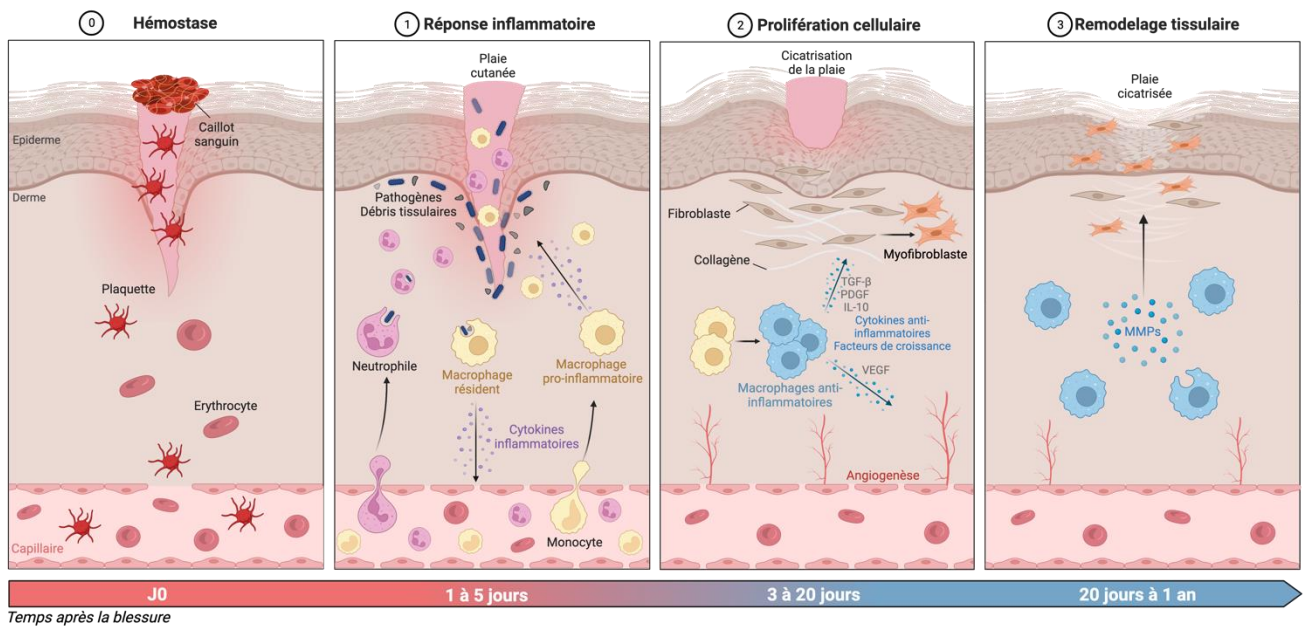


Figure 10. Étapes du processus de réparation tissulaire et implication des macrophages dans la cicatrisation. Les macrophages résidents éliminent les débris cellulaires et contribuent à l'initiation de la réponse inflammatoire qui permet le recrutement des neutrophiles et monocytes. Les monocytes se différencient en macrophages pro-inflammatoires. Durant la phase de prolifération cellulaire, les macrophages pro-inflammatoires switch vers un profil anti-inflammatoire. Ils produisent des cytokines anti-inflammatoires et des facteurs de croissance impliqués dans la résolution de l'inflammation, l'angiogenèse, la différenciation des fibroblastes et la synthèse de collagène. Pendant le remodelage tissulaire, les macrophages contribuent au remodelage de la matrice extracellulaire en sécrétant des métalloprotéases matricielles. VEGF, vascular endothelial growth factor; IL, interleukin; MMP, matrix metalloprotease; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- β , transforming growth factor- β .

1. Implication des macrophages résidents et des monocytes recrutés lors de la réponse inflammatoire

À la suite d'une lésion cutanée, les macrophages résidents sont rapidement activés par des signaux endogènes libérés par les tissus lésés (tels que ATP et HMGB-1 libérés par les cellules mortes et des composants de la matrice extracellulaire) ou par des signaux exogènes (PAMPs). Ces signaux de danger induisent leur polarisation en cellules inflammatoires (M1) qui vont eux-mêmes amplifier la réaction inflammatoire via la production de cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF α) et chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des monocytes au site de lésion (Figure 11) (Rodero et al., 2014; Hassanshahi et al., 2022). L'infiltration de monocytes est essentielle car la peau contient peu de macrophages résidents. Ainsi, de manière schématique, les macrophages résidents initient la réponse

inflammatoire et les macrophages dérivés des monocytes l'intensifient (Figure 10) (Minutti and Knipper, 2017). Plusieurs études ont montré que la déplétion des macrophages à un stade précoce de la phase inflammatoire induit un retard de re-épithélialisation, une diminution du dépôt de collagène, une altération de l'angiogenèse (production réduite de VEGF) et une épithélialisation altérée avec une altération de la formation de la cicatrice (Mirza et al., 2009; Lucas et al., 2010). L'absence de macrophages s'accompagne aussi d'une présence prolongée des neutrophiles et d'une contraction réduite de la plaie (Goren et al., 2009).

2. Rôles des macrophages lors de la phase de prolifération cellulaire

Les macrophages sont les cellules immunitaires majoritaires durant la phase de prolifération cellulaire (Lucas et al., 2010). La déplétion des macrophages au stade de la formation des tissus a des effets dévastateurs sur la progression de la cicatrisation et conduit à une hémorragie massive (Lucas et al., 2010; Rodero et al., 2014). En effet, la transition macrophages pro-inflammatoires → macrophages anti-inflammatoires (M2) est une étape clé de la réparation tissulaire (Meszaros et al., 2000; Mosser and Edwards, 2008). Cette transition est médiée principalement par l'élimination des cellules mortes, et notamment des neutrophiles (Fadok et al., 1998) mais ce phénotype peut aussi être induit par d'autres médiateurs tels que les cytokines IL-10, IL-4 et IL-13, les glucocorticoïdes et l'engagement de certains TLR (Figure 11) (Pinhal-Enfield et al., 2003; Daley et al., 2010; Koh and DiPietro, 2011). Ainsi, les macrophages décrits dans la littérature comme « macrophages réparateurs » peuvent être générés *in vitro* en présence d'IL-4 (Van Dyken and Locksley, 2013).

Les macrophages anti-inflammatoires (M2) atténuent l'inflammation et stimulent la réparation tissulaire en sécrétant des médiateurs anti-inflammatoires (tels que l'IL-10 et l'IL-1Ra). Ainsi, les souris déficientes en IL-10 présentent une réponse inflammatoire soutenue qui conduit à une augmentation du dépôt de collagène dans le tissu cicatriciel (Eming et al., 2007). Les macrophages sécrètent également des facteurs de croissance et des cytokines favorisant la synthèse de la MEC, l'angiogenèse ainsi que la prolifération et l'activation cellulaire (Figures 10 et 11) :

- TGF- α , EGF et OSM : migration et prolifération des kératinocytes,
- PDGF, TNF α , IL-1 et IL-6 : activation des fibroblastes.

Une fois activés, les fibroblastes favorisent à leur tour la migration et la prolifération des kératinocytes et la formation du tissu de granulation. L'un des rôles clés des macrophages lors de cette étape est leur implication dans la néo-angiogenèse médiée par leur production de VEGF. Les macrophages constituent la principale source de VEGF au cours de la phase précoce du processus de réparation

tissulaire (Willenborg et al., 2012). Cependant, à des stades plus tardifs, ce sont les cellules épidermiques qui prennent le relais comme source principale de VEGF.

Cependant, cette présentation schématique du processus de cicatrisation est plus complexe comme illustré par le rôle dual du TGF- β qui présente à la fois une activité anti-inflammatoire et contrôle la prolifération et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (Herold et al., 2011; Morikawa et al., 2016).

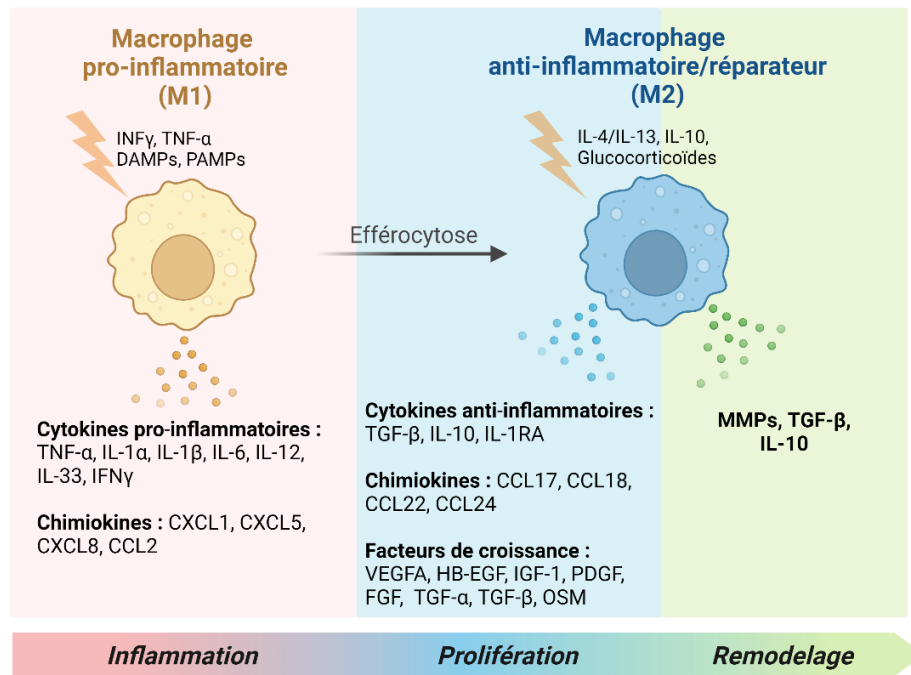


Figure 11. Polarisation des macrophages lors de la cicatrisation. CCL, C-C motif chemokine ligand; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; HB-EGF, Heparin-binding EGF; INF , interferon; IGF, insulin-like growth factor; IL, interleukin; MMP, matrix metalloprotease; OSM, Oncostatin M; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF, transforming growth factor; TNF, Tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. Inspirée de (Sousa et al., 2022)

3. Contribution des macrophages dans le remodelage tissulaire

La dernière étape de la cicatrisation est la phase de remodelage tissulaire, qui permet au tissu de retrouver sa structure d'origine. Au cours de cette phase, les macrophages contribuent à la résorption de l'inflammation et à l'élimination des cellules infiltrantes, ainsi qu'à au remodelage de la MEC via la sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP-1,9,10,12,13) (Gurtner et al., 2008; Madsen et al., 2013; Vannella and Wynn, 2017) (Figure 10). Une étude a ainsi montré que les souris déficientes en MMP-10 (MMP-10 $^{-/-}$) forment un tissu cicatriciel plus rigide et produisent plus de collagène que les souris sauvages (Rohani et al., 2015). De plus, les macrophages restaurent l'homéostasie tout en minimisant la fibrose via l'apoptose des myofibroblastes et la suppression de la prolifération des

lymphocytes T (Murray and Wynn, 2011). A l'issue du processus de réparation, les macrophages meurent par apoptose (Vannella and Wynn, 2017).

L'épuisement des macrophages cutanés dans la phase de remodelage tissulaire n'a pas d'impact significatif sur le résultat final de la cicatrisation, suggérant que les macrophages font partie d'un système redondant de réorganisation tissulaire et, qu'à ce stade de la cicatrisation, leurs fonctions pourraient être exercées par d'autres types cellulaires (Lucas et al., 2010).

C. Pathologies – Plaies chroniques et Fibrose

Un dysfonctionnement des macrophages peut conduire à une cicatrisation dérégulée avec un retard de cicatrisation des plaies (plaies chroniques) ou une cicatrisation « excessive » (fibrose). Des maladies sous-jacentes ou des facteurs externes peuvent contribuer à la défaillance du processus de guérison.

L'altération de la progression dans les étapes de la cicatrisation peut conduire à des **plaies chroniques**, caractérisées par une inflammation prolongée en grande partie due à la persistance de macrophages inflammatoires. Les facteurs favorisant les plaies chroniques comprennent les maladies veineuses, les infections, le diabète ainsi que les déficiences métaboliques chez les personnes âgées (Demidova-Rice et al., 2012). Les plaies diabétiques présentent une prédominance de macrophages inflammatoires M1 tout au long du processus de réparation tissulaire, contrairement à une cicatrisation normale. Cette situation découle d'une perturbation dans la transition des macrophages M1 vers un phénotype M2 (Mirza and Koh, 2011; Miao et al., 2012). Plusieurs facteurs affectent la polarisation des macrophages dans le diabète, parmi lesquels l'hyperglycémie a fait l'objet de nombreuses études (Huang et al., 2019; Louiselle et al., 2021). En effet, l'environnement hyperglycémique induit une augmentation des niveaux de ROS et de cytokines inflammatoires, créant ainsi un cercle vicieux maintenant la polarisation des macrophages M1 et donc une inflammation chronique. De plus, l'hyperglycémie réduit le processus d'efférocytose par les macrophages, bloquant la transition vers la phase de prolifération cellulaire et contribuant à la présence excessive de macrophages M1 (Khanna et al., 2010).

L'inflammation persistante des plaies chroniques entraîne également une augmentation de l'activité protéolytique, la dégradation continue de la matrice, l'absence de migration des fibroblastes dans la plaie ainsi que la réduction de la formation de vaisseaux sanguins, rendant impossible le passage à la phase de remodelage. C'est pourquoi la majorité de traitement des plaies chroniques repose sur la réduction de la glycémie pour diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires. La régulation de la polarisation des macrophages constitue également une nouvelle stratégie pour traiter la

cicatrisation des plaies diabétiques chroniques, notamment en inhibant l'activité des macrophages M1 ou en induisant la promotion de macrophages M2 (Sharifiaghdam et al., 2022).

La **fibrose**, ou cicatrisation excessive, est une perturbation du processus de réparation tissulaire qui conduit à un tissu cicatriciel étendu avec une accumulation excessive de collagène (Wynn and Ramalingam, 2012; Eming et al., 2017). La fibrose cutanée peut se manifester sous deux formes : les cicatrices chéloïdes (forte inflammation) et hypertrophiques (faible inflammation). La fibrose se caractérise par un excès de dépôt de collagène de type I au niveau de la MEC et une hyperactivité des MMPs après la formation de la cicatrice (Wells et al., 2016). La dysfonction des macrophages contribue au développement de la fibrose mais, contrairement aux plaies chroniques, ce sont les macrophages M2 qui sont associés à ce processus pathologique, notamment via la production de TGF- β , prototype des cytokines pro-fibrotiques (Wynn and Barron, 2010) et de facteurs de croissance (FGF, PDGF, IGF-1, VEGF) qui favorisent la prolifération des fibroblastes, producteurs de collagène.

En raison de leur rôle essentiel dans le processus de réparation tissulaire mais aussi de leur implication dans l'altération de la cicatrisation, les macrophages sont des cibles pour les thérapies qui visent à traiter les maladies associées à une mauvaise cicatrisation.

IV. Les corps cétoniques comme carburant alternatif

Comme mentionné précédemment, le phénotype des macrophages évolue en permanence en fonction des signaux qu'ils reçoivent localement. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont souligné l'importance des nutriments et des métabolites comme signaux régulant la polarisation des macrophages (Galván-Peña and O'Neill, 2014; O'Neill and Pearce, 2016).

Dans cette section, nous décrivons une famille de métabolites, **les corps cétoniques**, qui sont au cœur de ce projet de recherche.

A. Généralités

Les corps cétoniques sont des métabolites dérivés des lipides et synthétisés par les hépatocytes. Ils servent de source d'énergie alternative pour tous les tissus, à l'exception du foie, en période de jeûne ou d'exercice prolongé (Owen et al., 1969; Koeslag, 1980; Robinson and Williamson, 1980; Balasse and Féry, 1989). Pendant le jeûne, les réserves de glycogène sont les premières épuisées, avec pour conséquence un métabolisme glycolytique ne pouvant donc plus répondre aux besoins énergétiques. L'énergie est alors apportée par les corps cétoniques produits à partir de l'oxydation des acides gras mobilisés par les adipocytes. Les corps cétoniques sont ensuite distribués via la circulation vers les tissus métaboliquement actifs où ils sont convertis en acétyl-CoA.

Le terme corps cétoniques recouvre trois molécules : l'acétoacétate (AcAc), le β -hydroxybutyrate (β -OHB) et l'acétone. Cependant, l'acétone n'est pas convertie en acétyl-CoA et est éliminée dans les urines ou lors de l'expiration.

En condition physiologique, les niveaux de corps cétoniques circulants oscillent entre 50 et 250 μ M par jour, contribuant environ à 5% de la dépense énergétique totale à l'état nourri chez un adulte en bonne santé contre environ 20% à jeun (Balasse and Féry, 1989; Cahill, 2006). Lors d'un effort intense ou lors d'un jeûne, les niveaux de corps cétoniques circulant augmentent jusqu'à atteindre 1-2 mM (Cahill et al., 1966; Koeslag, 1980) voire 6-8 mM en cas de jeûne prolongé (Owen et al., 1969; Cahill, 2006). Des concentrations de l'ordre de 25 mM sont retrouvées chez des sujets présentant un diabète non contrôlé (Fukao et al., 2004).

Lors d'un régime cétogène (pauvre en glucides et riche en lipides), les niveaux de corps cétoniques circulants sont aux alentours de 2mM.

L'attention portée sur les corps cétoniques s'est intensifiée ces dernières années. De nombreuses études pré-cliniques et cliniques étudient les effets du jeûne intermittent, du régime cétogène ou encore de la consommation de corps cétoniques (compléments alimentaires) afin d'améliorer le bien-être et les capacités physiques, de lutter contre le vieillissement ou comme thérapie adjuvante dans certains cancers (Stubbs et al., 2017; de Cabo and Mattson, 2019; Caffa et al., 2020; Miller et al., 2020).

B. Synthèse des corps cétoniques

Le processus de synthèse des corps cétoniques, appelé cétogénèse, a lieu principalement dans le foie au niveau de la matrice mitochondriale.

La cétogénèse (Figure 12A) débute par le transport des acides gras délivrés par le tissu adipeux (lipolyse) vers la matrice mitochondriale des hépatocytes via l'enzyme carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1). Les acides gras sont alors métabolisés en acétyl-CoA suite à une β -oxydation. L'acétyl-CoA produit une molécule d'acétoacétyl-CoA (AcAc-CoA) sous l'action d'une thiolase mitochondriale. Ensuite, l'enzyme 3-hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase mitochondriale (HMGCS2) génère l'hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) en catalysant la condensation des molécules d'AcAc-CoA et d'acétyl-CoA. La HMG-CoA lyase (HMGCL) clive ensuite HMG-CoA permettant la libération d'AcAc et d'acétyl-CoA. L'AcAc sert de précurseur commun aux deux autres corps cétoniques (acétone et β -OHB). L'AcAc peut être libéré dans la circulation ou métabolisé en β -OHB par l'enzyme β -hydroxybutyrate déshydrogénase mitochondriale (BDH1). Le rapport AcAc/ β -OHB est proportionnel à l'équilibre mitochondrial NAD^+/NADH (Bock and Fleischer, 1975). L'AcAc est également capable de subir une décarboxylation spontanément en acétone (Pedersen, 1929).

L'AcAc et le β -OHB sont alors exportés des mitochondries hépatiques vers les tissus extra-hépatiques. Cependant, l'identité du transporteur mitochondrial des corps cétoniques reste inconnue ; les corps cétoniques sont ensuite transportés à l'extérieur des hépatocytes via les transporteurs monocarboxylates MCT1 et MCT2 puis sont importés via les MCT dans les tissus extra-hépatiques pour une oxydation terminale (Halestrap and Wilson, 2012).

En plus de la lipolyse des adipocytes, la cétogénèse peut être régulée par les flux hépatiques de glucides, les taux de β -oxydation des acides gras, la concentration des intermédiaires du cycle de Krebs et l'équilibre entre le glucagon et l'insuline (Williamson et al., 1969; McGarry and Foster, 1980; QUANT et al., 1989).

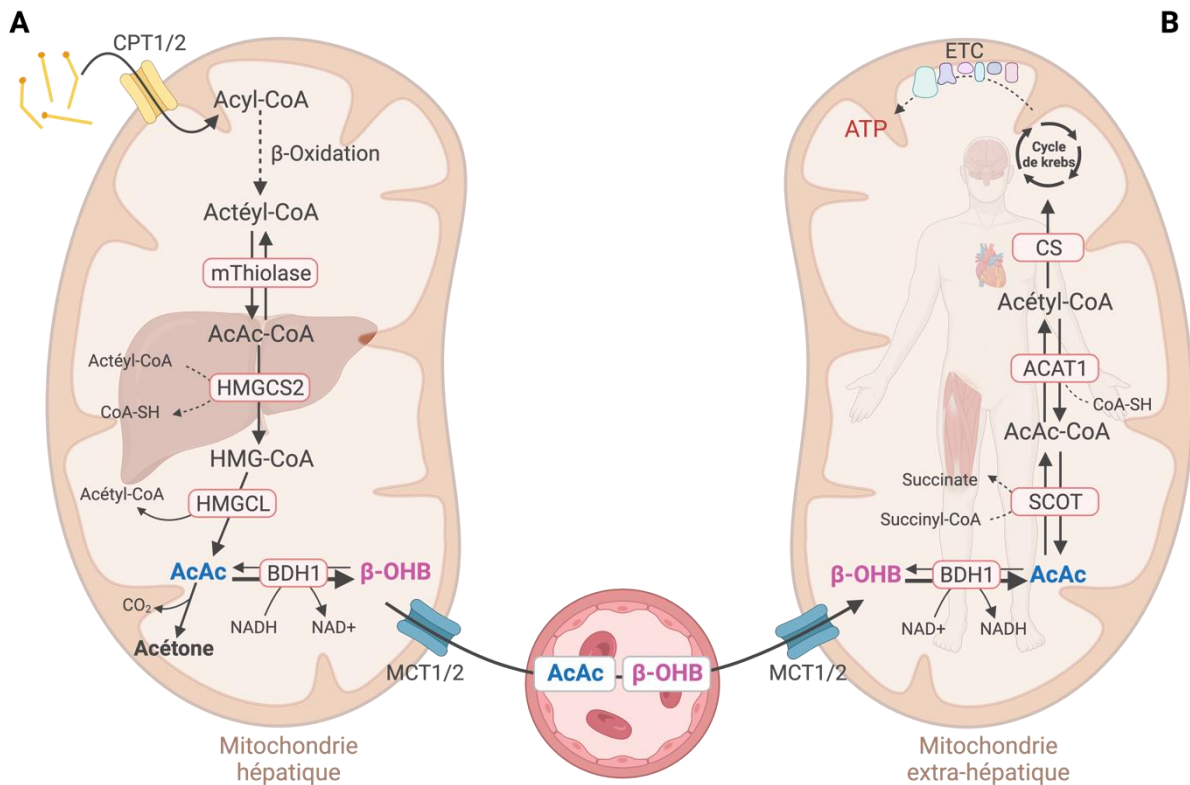


Figure 12. Synthèse et métabolisme des corps cétoniques. Représentation schématique de la production de corps cétoniques par les hépatocytes (A) et leur métabolisme dans les tissus extra-hépatiques (B). mThiolase, thiolase mitochondriale ; ETC, chaîne de transport d'électron ; CS, citrate synthase. Figure adaptée de (Puchalska and Crawford, 2017; Matsuura et al., 2023).

C. Rôles des corps cétoniques

1. Métabolisme et utilisation comme substrat énergétique alternatif

Une fois absorbés par les tissus cibles, les corps cétoniques sont transformés en acétyl-CoA via la cétolyse (Figure 12B). L'enzyme BDH1 catalyse la première réaction de conversion du β -OHB en AcAc. La conversion de l'AcAc en AcAc-CoA est catalysée par l'enzyme succinyl-CoA:3-cétoacideCoA transférase (SCOT, codée par Oxct1). Cette réaction est proche de l'équilibre par un échange de CoA entre le succinate et l'AcAc, le succinyl-CoA agissant comme donneur de CoA. L'enzyme SCOT est exprimée dans toutes les mitochondries des mammifères à l'exception des mitochondries hépatiques afin d'éviter l'oxydation des corps cétoniques par les cellules du foie.

L'AcAc-CoA va produire deux molécules d'acétyl-CoA via une réaction réversible catalysée par l'acétyl-CoA acétyltransférase 1 (ACAT1), une des quatre thiolases mitochondriales (Newman and Verdin,

2014). L'acétyl-CoA est alors disponible pour l'oxydation terminale dans le cycle de Krebs et la chaîne de transport d'électrons (ETC) pour la production d'ATP.

L'enzyme BDH1 présente également une expression sélective. Ainsi, les macrophages murins n'expriment pas l'enzyme BDH1. N'étant pas capables d'oxyder le β -OHB, ils ne peuvent utiliser que l'AcAc comme source d'énergie alternative (Puchalska et al., 2019).

2. Corps cétoniques et signalisation cellulaire

En plus de servir de substrat énergétique pour les tissus extra hépatiques, les corps cétoniques sont des acteurs clés dans la signalisation cellulaire, des moteurs de modifications post-traductionnelles (PTM) et sont impliqués dans la régulation de l'inflammation ou du stress oxydatif (Figure 13) (Puchalska and Crawford, 2021).

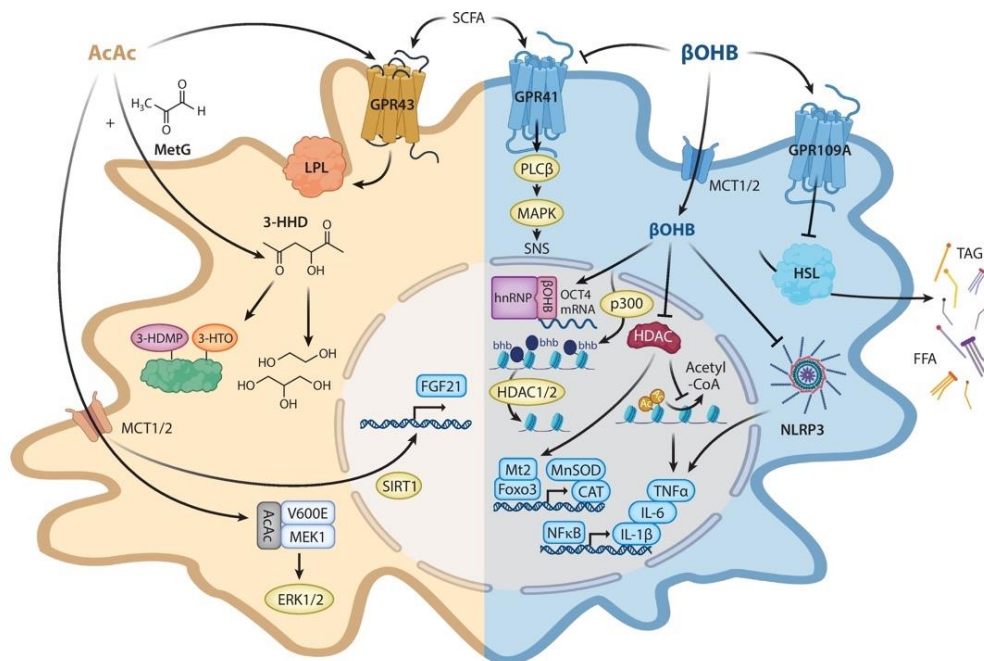


Figure 13. Voies de signalisation des corps cétoniques. L'AcAc et le β -OHB exercent différentes modifications/rôles cellulaires médiées par des modifications épigénétiques, post traductionnelles et récepteurs cellulaires. bbb, lysine β -hydroxybutyrylation ; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FFA, free fatty acid; FGF, fibroblast growth factor; GPR, G-protein coupled receptor; HDAC, histone deacetylase ; HSL, lipase hormono-sensible ; LPL, Lipoprotéine lipase ; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCT, monocarboxylate transporter; MEK, MAPK/ERK kinase ; PLC β , phospholipase C- β ; SIRT1, sirtuine; SNS, sympathetic nervous system; TAG, triacylglycerol; TNF, tumor necrosis factor. Figure tirée de (Puchalska and Crawford, 2021).

Cependant, peu de données sont connues sur les propriétés de signalisation de l'AcAc, la majorité des études concernant essentiellement le β -OHB.

a) *Transport et mécanismes de signalisation*

Une étude a montré qu'une perte de fonction de MCT1 induit une acidocétose (van Hasselt et al., 2014), pathologie induite lorsque la formation de cétones dépasse leur utilisation et entraînant une élévation de l'acidité du sang par accumulation de corps cétoniques. Ces observations démontrent un rôle crucial de MCT1 dans le transport et l'importation extra-hépatique des corps cétoniques.

L'AcAc et le β -OHB modulent la signalisation cellulaire via les récepteurs de surface couplés aux protéines G ou GPR (*G-protein coupled receptor*).

Le β -OHB est décrit comme un ligand pouvant se lier aux récepteurs GPR41 (également nommé FFA3R), exprimé par les adipocytes, les cellules entéro-endocrines et les monocytes, et GPR109A (PUMA-G ou HCAR2), exprimé par les adipocytes, les cellules microgliales et les cellules épithéliales du côlon (Tunaru et al., 2003). L'AcAc active le récepteur GPR43 (FFAR2). Les récepteurs GPR41 et GPR43 peuvent également être activés par les acides gras à chaîne courte, mais le β OHB est le seul ligand endogène connu du récepteur GPR109A.

Le β -OHB supprime directement l'activité du système nerveux sympathique et diminue la fréquence cardiaque en agissant comme antagoniste du récepteur GPR41, avec pour conséquence une inhibition de la voie de signalisation PLC β -MAPK au niveau des ganglions sympathiques (Kimura et al., 2011). Cependant, ces données sont contredites par l'étude de Won et al. qui ont montré que le β -OHB agit comme un agoniste de GPR41 plutôt qu'un antagoniste (Won et al., 2013).

En se liant à GPR109A exprimé par la microglie, le β -OHB induit une neuroprotection dans un modèle d'accident vasculaire cérébral chez la souris (Rahman et al., 2014). Le β -OHB est également impliqué dans une boucle de rétrocontrôle négatif lorsque les concentrations en corps cétoniques augmentent dans la circulation. Le mécanisme repose sur la capacité de β -OHB à inhiber la lipolyse du tissu adipeux via l'activation du récepteur GPR109A (exprimé par les adipocytes et les macrophages activés), conduisant ainsi à une diminution de la disponibilité des acides gras libres circulants (Taggart et al., 2005). Le β -OHB induit également la suppression du stress du réticulum endoplasmique dans les hépatocytes et l'accumulation de lipides chez des rats âgés via la voie de signalisation GPR109A/AMPK (Lee et al., 2020). Au contraire, l'AcAc favorise la lipolyse des adipocytes via l'activation du récepteur GPR43. La déficience du récepteur GPR43 inhibe l'utilisation des lipides induite par le jeûne, altère l'activité des lipoprotéines lipases plasmatiques et diminue la dépense énergétique (Miyamoto et al., 2019).

b) Corps cétoniques comme molécules de signalisation anti-inflammatoire

Le β -OHB présente des propriétés anti-inflammatoires sur les macrophages en activant GPR109A (Benyó et al., 2005) ainsi qu'en inhibant l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor pyrin-domain containing 3*) indépendamment de GPR109A (Youm et al., 2015; Bae et al., 2016; Goldberg et al., 2017). Le β -OHB supprime l'expression d'IL-6 et de CCL2 via des mécanismes dépendants de GPR109A (Gambhir et al., 2012). Le β -OHB inhibe l'inflammasome en réduisant les étapes d'amorçage et d'assemblage, ce qui bloque la conversion de la pro-caspase 1 en caspase 1 et réduit donc la maturation des cytokines IL-1 β et IL-18. L'inhibition de l'efflux de potassium est le mécanisme suggéré par lequel le β -OHB inhibe l'activation de l'inflammasome NLRP3.

De plus, en atténuant l'hyper-acétylation des protéines via l'activation de la citrate synthase et en inhibant de l'absorption des acides gras, le β -OHB normalise la fonction mitochondriale dans un modèle d'insuffisance cardiaque (Deng et al., 2021). Cependant, une étude menée chez des patients en situation d'obésité a montré que l'augmentation du β -OHB n'a pas d'impact sur la réponse inflammatoire (Neudorf et al., 2020).

c) Modifications épigénétiques et post-traductionnelles

Le β -OHB a été décrit comme un substrat impliqué dans les PTM des histones (β -hydroxybutyrylation, inhibition des HDAC et acétylation des histones) et la modulation de l'activité des canaux ioniques (Newman and Verdin, 2017).

Comme mentionné précédemment, l'hyper-acétylation des histones est le plus souvent associée à une augmentation de l'expression génique car elle facilite l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle. En supprimant les groupements acétyle, les HDAC répriment l'expression génique. Le β -OHB est décrit comme un inhibiteur endogène des HDAC de classe I. L'administration de β -OHB exogène (mais pas d'AcAc), le jeûne ou la restriction calorique induisent une hyper-acétylation des histones, en particulier sur les lysines 9 et 14 de l'histone 3 (H3K9/K14) via l'inhibition des HDAC de classe I (Shimazu et al., 2013). L'inhibition des HDAC est associée à la protection contre le stress oxydatif via une régulation positive de l'expression des gènes codant pour des molécules anti-oxydantes (FOXO3, SOD2, catalase) (Figure 13). De plus, le β -OHB inhibe HDAC3 ce qui induit l'acétylation de H3K14 au niveau du promoteur du gène codant pour la molécule claudin-5, avec pour conséquence une diminution de l'hyperperméabilité endothéliale cardiaque (Li et al., 2021).

Cependant, une étude a montré que l'impact du β -OHB en tant qu'inhibiteur des HDAC serait nettement inférieur à celui du butyrate, un inhibiteur classique des HDAC (Chriett et al., 2019).

En parallèle, une nouvelle modification post-traductionnelle des histones et permettant l'activation de la transcription a été identifiée : la β -hydroxybutyrylation des lysines (Kbhb), suggérant que le potentiel de régulation de l'expression génique du β -OHB pourrait également être médiée via la Kbhb (Xie et al., 2016). L'ajout du β -OHB sur la lysine est catalysé par l'enzyme acyltransférase p300 alors que HDAC1 et HDAC2 l'éliminent (Figure 13) (Huang et al., 2021). Quarante-six marques Kbhb sur les histones ont été identifiées par spectrométrie de masse *in vivo* et *in vitro*. Bien qu'une quarantaine de sites d'histone aient été identifiés, la majorité des études se sont concentrées sur l'hydroxybutyrylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9bhb) (Zhou et al., 2022). Cette marque est induite en présence d'une concentration élevée de β -OHB (jeûne prolongé, acidocétose diabétique) qui induit une augmentation H3K9bhb, elle-même impliquée dans la régulation des voies métaboliques sensibles au jeûne dans le foie et les intestins (Xie et al., 2016; Terranova et al., 2021). La Kbhb facilite donc la réponse au jeûne en liant métabolisme et expression génique.

Le catabolisme du β -OHB peut entraîner une augmentation des niveaux d'acétyl-CoA intracellulaire contribuant directement à l'acétylation des histones (Mehta et al., 2017). Une étude a montré que le β -OHB est une source majeure d'acétyl-CoA dans les cellules T CD8+, favorisant l'acétylation de H3K27 au niveau des loci de gènes effecteurs tels que IFN γ , Gzmb et Tbx21 (Luda et al., 2023).

Il existe encore peu de données sur la signalisation de l'AcAc. Cependant, bien que parcellaires, elles indiquent que celle-ci est distincte de celle du β -OHB (Figure 13). L'AcAc pourrait induire l'expression du facteur de croissance FGF21, qui joue un rôle clé dans la réponse aux stress métaboliques (tel que le jeûne prolongé) (Fisher and Maratos-Flier, 2016). Une étude a montré que l'AcAc induit la production de FGF21 dans les cellules hépatiques HepG2 de manière dépendante de la Sirtuine 1 (SIRT1) (Vilà-Brau et al., 2011). Cette voie suggère l'existence d'une boucle de rétrocontrôle dans laquelle la cétogenèse, via l'AcAc, active une réponse médiée par la SIRT1 afin de réguler l'oxydation des acides gras.

De plus, l'AcAc, produit de manière endogène ou apporté de manière exogène, favorise la liaison de BRAF V600E à la protéine kinase MEK1 induisant l'activation de la voie MEK-ERK dans les cellules cancéreuses BRAF-V600E+ (Kang et al., 2015). L'activation de cette voie entraîne la prolifération et la croissance des cellules tumorales.

D. La diète cétogène

1. Généralités

À l'origine préconisée comme thérapie pour l'épilepsie depuis 1920, la diète cétogène a récemment gagné en popularité. En effet, l'attention portée sur les corps cétoniques s'est intensifiée ces dernières années, notamment avec le jeûne intermittent, la diète cétogène ou encore l'application de cétones exogènes dans le but d'améliorer la qualité de vie et les performances physiques, de contrer les effets du vieillissement ou de lutter contre certaines maladies.

La diète cétogène est un régime alimentaire qui imite le métabolisme à jeun pour induire la production de corps cétonique. C'est un régime isocalorique riche en graisse, faible en glucide et avec une quantité de protéine modérée. Il existe quatre déclinaisons de régime cétogène : régime cétogène standard, régime cétogène cyclique, régime cétogène ciblé et régime cétogène riche en protéines.

Le régime cétogène standard est le plus étudié : il contient 70 % de matières grasses, 20 % de protéines et 10 % de glucides (% en apport calorique quotidien total). La faible teneur en glucides prive l'organisme de glucose en tant que principale source d'énergie, favorisant ainsi l'utilisation des corps cétoniques produits par β -oxydation. Le régime cétogène a depuis longtemps été reconnu comme une approche diététique très efficace pour traiter les épilepsies pharmaco-résistantes et a suscité un intérêt croissant ces dernières années en raison de nouvelles preuves du potentiel thérapeutique de ce régime pour diverses pathologies autres que l'épilepsie. En effet, des données récentes indiquent que le régime cétogène pourrait également jouer un rôle thérapeutique dans les maladies métaboliques, les troubles neurologiques, les maladies cardiovasculaires ou encore certains types de cancers.

2. Applications thérapeutiques

a) *Épilepsie*

Le régime cétogène a été utilisé pour la première fois en 1921 par Russell Wilder pour traiter l'épilepsie (Wilder, 1921). D'après les propriétés antiépileptiques de la famine rapportées par Gulep et Marie en 1911, Wilder a suggéré que les avantages observés lors du jeûne pourraient dépendre de la cétose. Pour cela, il a mis en place un régime cétogène et a observé une réduction de la fréquence et de l'intensité des crises épileptiques chez les patients traités. La diète cétogène a alors été considérée

comme une option thérapeutique pour l'épilepsie pédiatrique pendant près d'une décennie, mais son utilisation a régressé avec l'introduction des médicaments antiépileptiques (Wheless, 2008; Ułamek-Kozioł et al., 2019). La diète cétogène est réapparue dans les années 1990 afin de traiter l'épilepsie infantile pharmaco-résistante (Neal et al., 2008). En 2008, Neal et son équipe ont mené le premier essai clinique contrôlé pour évaluer l'effet du régime cétogène sur des enfants (entre 2 et 16 ans) souffrants d'une épilepsie qui ne répondait pas aux traitements antiépileptiques. Après trois mois, le groupe sous diète cétogène présentait une réduction de 75 % de la fréquence des crises par rapport au groupe témoin et près de 40 % ont présenté une diminution de l'intensité des crises.

D'autres études chez des adultes atteints d'épilepsie réfractaires ont fourni de nouvelles preuves de l'efficacité de ce régime. Une méta-analyse de 16 études (338 patients) a révélé que 13% des sujets sous régime cétogène avaient une absence de crises et que 53 % des patients avaient une réduction des crises de plus de 50% (Liu et al., 2018).

b) Maladies neurodégénératives

Suite aux données émergentes de l'utilisation du régime cétogène dans le traitement de troubles neurologiques (tel que l'épilepsie), certains chercheurs se sont intéressés au potentiel de ce régime dans le traitement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Włodarek, 2019; Dyrka et al., 2022). Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent un dysfonctionnement mitochondrial et des altérations métaboliques, caractérisés notamment par une diminution de l'utilisation du glucose dans le cerveau, consécutive à une réduction du nombre et de la fonction des transporteurs du glucose. La diète cétogène favorise l'utilisation des corps cétoniques comme source d'énergie pour remplacer le glucose dans le SNC (McDonald and Cervenka, 2018).

Plusieurs études ont évalué les effets cognitifs d'un régime cétogène chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Tabaie et al., 2021). En atténuant les altérations du métabolisme énergétique cérébral, le régime cétogène conduit à une amélioration de la cognition, du fonctionnement au quotidien et de la qualité de vie des patients par rapport à un régime habituel (Taylor et al., 2018; Phillips et al., 2021). Une étude a également montré que l'administration, pendant 12 semaines, de triglycérides à chaîne moyenne à des patients atteints de la maladie d'Alzheimer augmente les fonctions cognitives. Les patients ayant un taux plasmatique de corps cétoniques augmenté ont montré une amélioration significative du test de codage des symboles numériques et des tests de mémoire immédiate (Ota et al., 2019).

Le régime cétogène semble également avoir un effet bénéfique sur l'évolution de la maladie de Parkinson. Il a ainsi été montré que le β -OHB agit *in vitro* comme un agent neuroprotecteur sur les

neurones dopaminergiques (Kashiwaya et al., 2000; Tieu et al., 2003). Une étude clinique a montré que des patients atteints de la maladie de Parkinson sous régime cétogène présentaient une amélioration globale de l'échelle d'évaluation unifiée pour la maladie de Parkinson (VanItallie et al., 2005).

c) Troubles métaboliques : Diabète de type 2 et obésité

Plusieurs études ont mis en lumière l'amélioration des troubles métaboliques par le régime cétogène tels que le diabète de type 2 et l'obésité.

Le diabète de type 2 est caractérisé par une hyperglycémie chronique avec une anomalie du profil lipidique. Le contrôle de la glycémie et du poids des patients sont donc les exigences principales d'une gestion efficace du diabète. De nombreuses études soutiennent l'effet positif d'un régime faible en glucides et riche en graisse chez les personnes atteintes de diabète de type 2 (Bolla et al., 2019). Il a été rapporté que le régime cétogène améliore la régulation de la glycémie chez ces individus en réduisant l'absorption du glucose, les niveaux de glucose plasmatique, le taux de lipoprotéines de basse densité (LDL) ainsi que l'hémoglobine glyquée (HbA1c) en renforçant la sensibilité systémique à l'insuline et en augmentant le taux de lipoprotéines à haute densité (HDL) (Yancy et al., 2005; Yuan et al., 2020; Li et al., 2022). Par ailleurs, l'obésité étant étroitement liée à l'incidence du diabète de type 2, diverses études ont mis en évidence les avantages du régime cétogène chez des patients en situation d'obésité avec une réduction du poids corporel et de l'indice de masse corporelle (Dashti et al., 2004; Paoli et al., 2013; Muscogiuri et al., 2019). Le régime cétogène est donc efficace pour améliorer les paramètres métaboliques associés au contrôle de la glycémie, de la masse pondérale ainsi qu'au contrôle lipidique chez les patients en situation d'obésité et/ou atteints de diabète de type 2 (Choi et al., 2020). Il a récemment été rapporté que ce régime peut aussi être présenter des effets bénéfiques sur divers facteurs de risque cardiovasculaire chez les individus atteints de diabète de type 2 (Jayedi et al., 2022).

d) Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès dans le monde avec une augmentation significative au cours de ces dernières années. De nombreuses études ont souligné l'intérêt du régime cétogène comme modèle nutritionnel dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires du fait de sa capacité à participer au contrôle du système cardiovasculaire (Dyrka et al., 2022). L'un des principaux facteurs de risques des maladies cardiovasculaires est la dyslipidémie (taux de cholestérol et de triglycérides élevés). Comme mentionné précédemment, le régime cétogène

est bénéfique sur le profil lipidique en induisant une réduction du cholestérol total (diminution du cholestérol LDL et des triglycérides) et une augmentation du taux de lipoprotéines HDL (Gardner et al., 2022; Li et al., 2022).

Les autres avantages de ce régime dans ces pathologies sont son potentiel anti-inflammatoire et cardioprotecteur (lié à l'inhibition de l'activation de NLRP3), la restriction glucidique et l'induction d'acide gras anti-inflammatoires du groupe oméga-3. Une étude a montré que les cellules endothéliales cardiaques sont capables d'oxyder les corps cétoniques avec pour conséquence une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules ainsi que de l'angiogenèse (Weis et al., 2022). De plus, il a été rapporté que l'oxydation des corps cétoniques dans les cardiomyocytes améliore leur efficacité respiratoire dans un modèle d'insuffisance cardiaque (Horton et al., 2019). En plus d'améliorer les fonctions des cellules endothéliales, les corps cétoniques retardent leur vieillissement prématuré. Ces effets confirment l'impact bénéfique du régime cétogène sur la pression artérielle (avec une réduction de la pression artérielle systolique et diastolique) et d'autres facteurs de risque indirects des maladies cardiovasculaires, comme la réduction du surpoids corporel (Bueno et al., 2013; Barrea et al., 2023).

e) *Cancer*

Plusieurs effets inhibiteurs du régime cétogène ont été proposés sur la croissance des cellules tumorales (Weber et al., 2020). Dans les cellules tumorales, la majeure partie de l'énergie provient de la glycolyse aérobie plutôt que de la phosphorylation oxydative, même en présence de quantités suffisantes d'oxygène. Ce mécanisme est appelé l'effet Warburg.

Lors de ce processus, le glucose est réduit en lactate plutôt que converti en acétyl-CoA mitochondrial, ce qui conduit à une accumulation de lactate dans le TME, créant un environnement acide qui favorise la croissance tumorale. En réduisant la disponibilité en glucose et en augmentant la β -oxydation des acides gras, le régime cétogène favorise donc le passage de la glycolyse aérobie à la phosphorylation oxydative mitochondriale dans les cellules tumorales. De plus, en réduisant la glycémie, on observe également une réduction des niveaux d'insuline, facteur important dans la prolifération des cellules cancéreuses. Plusieurs études pré-cliniques montrent que le régime cétogène augmente la sensibilité des cellules cancéreuses aux chimiothérapies classiques ou aux radiothérapies (Allen et al., 2013; Klement, 2018).

Cependant, la sensibilité des cellules tumorales au régime cétogène est très variable selon le type de tumeur malgré des signatures métaboliques similaires. Le régime cétogène supprime la croissance du

neuroblastome présentant un déficit en OXPPOS (Morscher et al., 2015), alors que le même régime a conduit à des résultats différents dans le carcinome rénal (Vidali et al., 2017).

Dans l'ensemble, les résultats des études pré-cliniques, malgré quelques contradictions, suggèrent plutôt un effet antitumoral que pro-tumoral du régime cétogène pour la majorité des cancers solides. Ces études indiquent également que l'utilisation du régime cétogène comme traitement adjuvant dépend fortement du type de tumeur. Le régime cétogène semble être une option comme thérapie adjuvante dans le traitement de certains cancers (neuroblastome, cancer colorectal, glioblastome, cancer du pancréas et du poumon) (Weber et al., 2018).

f) Longévité et bien être

Le régime cétogène est capable de prolonger la durée de vie et d'améliorer la santé et la mémoire des souris mâles adultes. Dans une première étude, des souris adultes (12 semaines) ont été nourries alternativement toutes les deux semaines avec un régime cétogène ou un régime conventionnel. Cette étude a révélé qu'une exposition à long terme à un régime cétogène réduit la mortalité en milieu de vie (entre 12 mois et 36 mois) et préserve la mémoire chez les souris mâles âgées (Newman et al., 2017).

Dans une seconde étude, des souris mâles adultes nourries sous régime cétogène à partir de 12 mois voient leur durée de vie significativement augmentée comparativement aux souris sous régime conventionnel (augmentation de 13,6 % de la durée de vie médiane). Les souris âgées nourries avec un régime cétogène présentaient une préservation des fonctions motrices, des fonctions cognitives ainsi que de la masse musculaire, comparativement aux souris témoins. Ces observations pourraient être expliquées par l'augmentation des niveaux d'acétylation des protéines et la diminution de la signalisation mTORC1, un régulateur central de la durée de vie et du vieillissement.

Travaux réalisés

I. Rationnel et objectifs de l'étude

Les macrophages sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, tels que l'homéostasie, l'initiation et la résolution de l'inflammation, la destruction des microbes et la réparation tissulaire. Cette diversité fonctionnelle est associée à une grande diversité phénotypique (Wynn and Vannella, 2016b). L'acquisition de ces différents phénotypes est dictée par la nature et la quantité de signaux présents, localement, dans le tissu dans lequel ils résident.

Les macrophages sont des acteurs clés du processus cicatrisation des plaies (Krzyszczuk et al., 2018) et sont indispensables à chacune des étapes de ce processus. Les macrophages impliqués dans la cicatrisation dérivent principalement des monocytes recrutés. Ils acquièrent d'abord un phénotype inflammatoire de type M1 pour soutenir l'inflammation et la défense antimicrobienne, puis un phénotype de type M2 pour promouvoir la réparation des tissus. Cependant, les facteurs qui contrôlent la polarisation des macrophages pendant la cicatrisation restent mal connus.

Des études ont proposé un rôle central de l'IL-4 dans la génération des macrophages avec un phénotype réparateur (Van Dyken and Locksley, 2013). Cependant, le processus de cicatrisation n'est pas altéré chez les souris déficientes en récepteur d'IL-4 (Daley et al., 2010), ce qui suggère l'implication d'autres facteurs.

Au cours des dernières années, différentes études ont souligné l'importance des nutriments et des métabolites comme signaux de polarisation des macrophages (Galván-Peña and O'Neill, 2014; O'Neill and Pearce, 2016). Les corps cétoniques AcAc et β -OHB servent de carburant alternatif pour les cellules extra-hépatiques lorsque les taux sanguins de glucose sont bas (Grabacka et al., 2016). Il a récemment été rapporté que le phénotype des macrophages humains et murins peut être modulé par l'AcAc. Puchalska et al ont montré que les souris dont les macrophages sont déficients en SCOT développent une fibrose hépatique sous régime riche en graisses (HFD), suggérant un rôle de l'AcAc dans l'homéostasie tissulaire (Puchalska et al., 2019). De plus, le laboratoire a montré que l'AcAc protège les macrophages de la pseudostarvation induite par l'acidose lactique, suggérant qu'elle pourrait augmenter la tolérance des tissus à un stress métabolique (Adam et al., 2021).

Les objectifs de mon projet de thèse étaient donc d'évaluer l'impact *in vitro* du corps cétonique AcAc sur la polarisation fonctionnelle des macrophages humains d'un point de vue phénotypique, métabolique et transcriptomique.

II. Matériel et méthode

Notre approche expérimentale reposait sur des expériences :

- *In vitro* pour évaluer l'impact de l'AcAc sur le profil phénotypique et transcriptomique des macrophages humains. Pour cela, des monocytes humains ont été générés avec du M-CSF, en présence (AcAc-M ϕ) ou en absence d'AcAc (M ϕ). Les signatures cytokinique (ELISA, cytométrie en flux), transcriptomique (RT-qPCR) et épigénétique (immunoprécipitation de chromatine ; CHIP) ont été comparées entre AcAc-M ϕ et M ϕ . Le rôle des voies métaboliques a été validé à l'aide d'inhibiteurs chimiques ou par extinction de gènes (siRNA).
- *In vivo* pour valider le potentiel d'un régime cétogène sur la génération de macrophages réparateurs dans un modèle de cicatrisation cutanée.

III. Résumé des résultats

Les principaux résultats obtenus sont résumés ci-dessous :

A. L'acétoacétate confère aux macrophages humains un profil réparateur

L'AcAc confère aux macrophages humains un profil réparateur. De manière surprenante, nous avons observé que les AcAc-M ϕ acquièrent de manière séquentielle l'expression de gènes impliqués dans les différentes phases de la réparation tissulaire avec (i) une expression précoce des transcrits codant pour les gènes de l'inflammation (IL-6, IL-1 β), (ii) une expression du facteur angiogénique VEGF-A et des gènes impliqués dans la phase de prolifération cellulaire aux temps intermédiaires (J2-J3) et (iii) une augmentation de l'expression des transcrits codant pour des gènes impliqués dans la migration cellulaire et le remodelage tissulaire (OSM et métalloprotéases) aux temps les plus tardifs.

De plus, les AcAc-M ϕ sont distincts des macrophages générés en présence d'IL-4, décrits dans la littérature comme les prototypes réparateurs.

B. La métabolisation de l'AcAc induit un phénotype réparateur médié par des modifications épigénétiques

La métabolisation de l'AcAc par les monocytes au cours de leur différenciation est nécessaire à la génération des AcAc-M ϕ . Plus particulièrement, nous avons observé que la capacité de l'AcAc à moduler le phénotype des M ϕ dépend de la synthèse d' α -cétoglutarate (α -KG) via la navette malate-aspartate. De plus, l'expression séquentielle des transcrits induits par l'AcAc suggère une régulation épigénétique. L' α -KG est décrit comme un cofacteur essentiel pour l'activité de l'histone déméthylase Jmjd3, qui catalyse la déméthylation de H3K27me3 (marque épigénétique répressive). Nous montrons ici que l'AcAc, via la synthèse d' α -KG, induit l'activation de Jmjd3 qui permet la déméthylation d'H3K27me3 sur les promoteurs des gènes d'intérêts, induisant leur expression par les AcAc-M ϕ . L'ensemble de ces résultats montre que le phénotype AcAc-M ϕ dépend d'une régulation épigénétique médiée par l' α -KG.

C. Le régime cétogène accélère la cicatrisation des plaies cutanées

Nous avons ensuite évalué l'impact *in vivo* d'un régime cétogène sur la cicatrisation de la peau. Les résultats montrent que la vitesse de fermeture de la plaie est significativement plus rapide chez les souris nourries sous diète cétogène (KD) que chez les souris témoins nourries sous régime standard (SD). De plus, une analyse transcriptomique des M ϕ infiltrant isolés du tissu cicatrisé a révélé une différence de phénotype entre les M ϕ isolés des souris KD vs SD. En effet, les macrophages isolés des souris KD montrent une diminution de l'expression d'IL-1 β et une augmentation de l'expression de MMP9 au début de la cicatrisation (J1-J3). De plus, l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et le remodelage tissulaire (PLAT et TNC) est augmentée chez les souris KD vs SD plus tardivement dans le processus de cicatrisation (J7-J10).

Ces résultats montrent que la diète cétogène améliore la cicatrisation d'une plaie cutanée et que cet effet est associé à une augmentation de l'expression des molécules impliquées dans la réparation des tissus par les M ϕ infiltrant la peau.

D. Conclusion

Cette étude a permis d'identifier l'acétoacétate comme un métabolite unique capable de favoriser la génération d'un phénotype fonctionnel réparateur des macrophages avec une acquisition séquentielle des marqueurs de la réparation et d'accélérer la cicatrisation des plaies cutanées.

IV. Manuscrit

Ce travail a constitué la base d'un manuscrit soumis pour publication (cf pages 72 à 112).

Acetoacetate confers a wound-healing phenotype to macrophages and favors skin healing

Marine Monnier¹, Laurence Preisser¹, Léa Paolini¹, Clément Adam¹, Pascale Pignon¹, Simon Blanchard^{1,2}, Raffaella Soleti¹, Naïg Gueguen^{3,4}, Pascal Reynier^{3,4}, Chloé Delépine¹, Cinzia Bocca³, Quentin Massiquot⁵, Dominique Couez¹, Alain Morel^{1,6}, Isabelle Tournier^{1,6}, Vincent Procaccio^{3,4}, Marie Christine Copin^{1,7}, Yves Delneste^{1,2,*}, Céline Beauvillain^{1,2}, Pascale Jeannin^{1,2,*}

¹ Univ Angers, Nantes Université, Inserm, CNRS, SFR ICAT, CRCI²NA, F-49000 Angers, France

² University Hospital of Angers, Laboratory of Immunology and Allergology, F-49000 Angers, France

³ Univ Angers, Inserm, CNRS, SFR ICAT, MitoVasc, F-49000 Angers, France

⁴ University Hospital of Angers, Biochemistry and Genetics Department, F-49000 Angers, France

⁵ Univ Angers, Federative research structure ICAT, F-49000 Angers, France

⁶ ICO Cancer Research Center, F-49000 Angers, France

⁷ University Hospital of Angers, Department of cell and tissue pathology, F-49000 Angers, France

* CB and PJ are equivalent supervisors

Corresponding author. Pr Pascale Jeannin, CRCI²NA, University Hospital of Angers, IBS, 4 rue Larrey, F-49000 Angers; pascale.jeannin@univ-angers.fr

Key words. Macrophages, ketogenic diet, acetoacetate, wound healing

Abbreviations. α -KG, alpha-ketoglutarate; ACAT1, acetyl-CoA acetyltransferase; AcAc, acetoacetate; AOAA, aminooxyacetic acid; β -OHB, β -hydroxybutyrate; BMDM, bone marrow-derived macrophage; CHC, α -cyano-4-hydroxycinnamate; ChIP, chromatin immunoprecipitation; EZH2, enhancer of zeste homolog 2; F3, clotting factor III; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GOT, Glutamic-Oxaloacetic Transaminase; HB-EGF, heparin-binding epithelial growth factor; HFD, high-fat diet; HMGCS2, 3-hydroxymethylglutaryl-CoA synthase; Jmjd3, Jumonji domain-containing protein-3; M ϕ , macrophage; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MCT, monocarboxylic acid transporter; OCR, oxygen consumption rate; OM, Oxalomalate; OSM, oncostatin M; PLAT, plasminogen activator, tissue type; PLAU, plasminogen activator, urokinase; SCOT, succinyl-CoA-oxoacid transferase; TCA, tricarboxylic acid; TNC, tenascin; UTX, ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat on chromosome X; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Abstract

Macrophages (M ϕ) are involved in many physiological processes, including tissue repair and tissue homeostasis. They continuously adapt their phenotype to signals present in their environment to respond to tissue demand and accumulating evidence underlines the role of metabolites in their polarization. In this study, we investigated the impact of the ketone body AcAc on the polarization of human M ϕ . We report that AcAc increases, in a time-dependent manner, the expression of genes involved in the wound healing process consecutive to its metabolism. Interestingly, these M ϕ are distinct from the prototypic wound healing M ϕ generated in the presence of IL-4. Moreover, the acquisition of this phenotype was dependent on the synthesis of α -KG via the malate-aspartate shuttle and relied on epigenetic modifications involving the histone demethylase Jmjd3. Finally, we observed that a ketogenic diet accelerates wound closure in a mouse model of skin repair. In conclusion, this study identifies AcAc as a crucial metabolite to induce the generation of a unique subtype of M ϕ exhibiting a unique wound healing phenotype.

Introduction

Macrophages (M ϕ) are innate immune cells present in all tissues. They are involved in many physiological processes, such as anti-infective immunity, tissue repair and tissue homeostasis. M ϕ continuously adapt their phenotype to signals present in their environment to respond to tissue demand (Okabe & Medzhitov, 2016; Xue *et al*, 2014). They can thus acquire a large variety of phenotypes, reflecting a diversity of functional polarization (Mosser & Edwards, 2008). Although this diversity makes any classification difficult, and for simplification reasons, the M1/M2 dichotomy remains often used. M1 cells are characterized by the production of pro-inflammatory cytokines and IL-12 and exhibit anti-infectious properties while, in contrast, M2 cells express regulatory cytokines and growth factors and exhibit immunoregulatory properties (Mosser & Edwards, 2008; Mantovani *et al*, 2002).

M ϕ are key players of wound healing (Krzyszczuk *et al*, 2018; Minutti & Knipper, 2017) , a process that can be schematically divided in three consecutive phases that overlap in time: inflammation, proliferation, and tissue remodeling (Gurtner *et al*, 2008; Ding & Tredget, 2015; Martin, 1997). The phenotypes of M ϕ are adapted to the different phases of the wound healing process. M ϕ secrete cytokines and chemokines that control the initiation and resolution of inflammation and secrete growth and angiogenic factors as well as metalloproteinases that promote epithelial and endothelial cell proliferation during the remodeling phase (Wynn & Barron, 2010). Importantly, M ϕ are essential at each step of the wound healing (Minutti *et al*, 2017), as illustrated by the consequences of their depletion (delayed epithelialization, impaired angiogenesis, reduced collagen synthesis) (Mirza *et al*, 2009; Goren *et al*, 2009). Moreover, a selective depletion of M ϕ during the inflammatory or the epithelialization phases also impairs tissue healing (Lucas *et al*, 2010). M ϕ involved in the wound healing process mainly derive from monocytes recruited upon tissue injury. They initially acquire an inflammatory M1-like phenotype to support inflammation and microbial defense and then a M2-like phenotype to promote tissue repair (Novak & Koh, 2013). Factors that control M ϕ polarization during wound healing remain unknown. Studies have proposed a pivotal role for IL-4, thanks to its capacity to favor *in vitro* the generation of M ϕ with a wound healing phenotype (Van Dyken & Locksley, 2013). Nevertheless, the healing process is not altered in IL-4 receptor-deficient mice (Daley *et al*, 2010), suggesting the involvement of other factors. Interestingly, accumulating evidence underlines the role of metabolites in the polarization of M ϕ (O'Neill & Pearce, 2016; Saha *et al*, 2017). Whether metabolites may be involved in wound healing remains largely unknown.

The ketone bodies acetoacetate (AcAc) and β -hydroxybutyrate (β -OHB) are alternative fuels for extrahepatic cells (McGarry & Foster, 1980; Robinson & Williamson, 1980; Puchalska & Crawford, 2017; Cahill, 2006). They are primarily produced by hepatocytes under reduced carbohydrate availability by using fatty acid-derived acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) which is metabolized by 3-hydroxymethylglutaryl (HMG)-CoA synthase (HMGCS2). AcAc and β -OHB circulate to extrahepatic tissues where they are oxidized to acetyl-CoA, supplying the tricarboxylic acid cycle (TCA) via succinyl-CoA-oxoacid transferase (SCOT) and acetyl-CoA acetyltransferase (ACAT1). Recent studies reported that the phenotype of human and murine M ϕ are modulated by AcAc. Puchalska et al showed that mice with SCOT-deficient M ϕ develop hepatic fibrosis under high-fat diet (HFD), suggesting a role for AcAc in tissue homeostasis (Puchalska *et al*, 2019). We recently reported that AcAc protects M ϕ from lactic acidosis-induced pseudostarvation, suggesting that it may increase tissue tolerance to a metabolic stress (Adam *et al*, 2021).

In this study, we evaluated the impact of AcAc on the functional polarization of human M ϕ . We report that AcAc induces sequentially the expression of a set of genes involved in the wound healing process and that this effect was mediated by epigenetic modifications involving the histone demethylase Jmjd3. Finally, we observed that a ketogenic diet accelerates wound closure in a mouse model of skin repair.

Results

Acetoacetate induces a wound-healing phenotype in M ϕ .

We first analyzed the impact of AcAc on *in vitro* generated human M ϕ . Monocytes were cultured for 5 days with M-CSF, in the absence (M ϕ) or presence of 5 mM AcAc (AcAc-M ϕ), a concentration corresponding to the circulating levels of ketone bodies during prolonged fasting (Owen *et al*, 1969; Garber *et al*, 1974). AcAc-M ϕ expressed elevated levels of the M ϕ markers CD14 and CD163 but did not express the dendritic cell marker CD1a (Fig. 1A) and exhibited a phagocytic activity similar to M ϕ (Fig. 1B). In response to LPS, AcAc-M ϕ exhibited an IL-10^{hi} IL-12^{lo} phenotype, similar to M ϕ generated in the presence of M-CSF (Fig. 1A). The phenotype of AcAc-M ϕ was distinct to M1-like cells (CD14^{lo} CD163^{lo} CD1a^{lo} IL-10^{lo} IL-12^{hi}) (Fig. 1A).

Interestingly, compared to M ϕ , AcAc-M ϕ produced significantly higher levels of the growth factors VEGFA, OSM and HB-EGF (Fig. 1C) and G-CSF (Fig. 1D) and of the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α , although at lower levels than M1-like cells (Fig. 1D). RT-qPCR analysis revealed that, compared to M ϕ , AcAc-M ϕ expressed high levels of mRNA encoding chemokines involved in the recruitment of dendritic cells (*CCL20*, *CCL18*), NK cells (*CCL3L1*), neutrophils (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL5*) and Treg lymphocytes (*CCL22*), as well as hemostatic factors, such as the clotting factor III (*F3*) and the fibrinolytic proteases *PLAT* and *PLAU* (Fig. 2A and Supplemental Fig. S1). Interestingly, the expression of pro-fibrotic genes was decreased (*IGF1*, *PDGF α*) or not modulated (*TGF- β 1*) in AcAc-M ϕ compared to M ϕ (Supplemental Fig. S1).

The cytokine profile of AcAc-M ϕ suggested a tissue repair phenotype (Fig. 2A), as evidenced by the induction of molecules involved in the different phases of the wound healing process, hemostasis (*F3*, *PLAT*, *CXCL1*), inflammation (*CXCL1*, *IL-1 α* , *TNF α* , *CCL3L1*, *CCL25*, *IL-36 γ* , *CXCL2*, *CCL16*, *CCL22*), proliferation (*IL-36 γ* , *CXCL2*, *CCL16*, *CCL22*, *CXCR4*, *ANGPTL4*) and tissue remodeling (*ANGPTL4*, *MMP7*) (Fig. 1A).

An extensive list of genes differentially expressed between AcAc-M ϕ and M ϕ is presented in Supplemental Fig. S1. We also observed that these transcripts were expressed in a time-dependent manner (Fig. 2B).

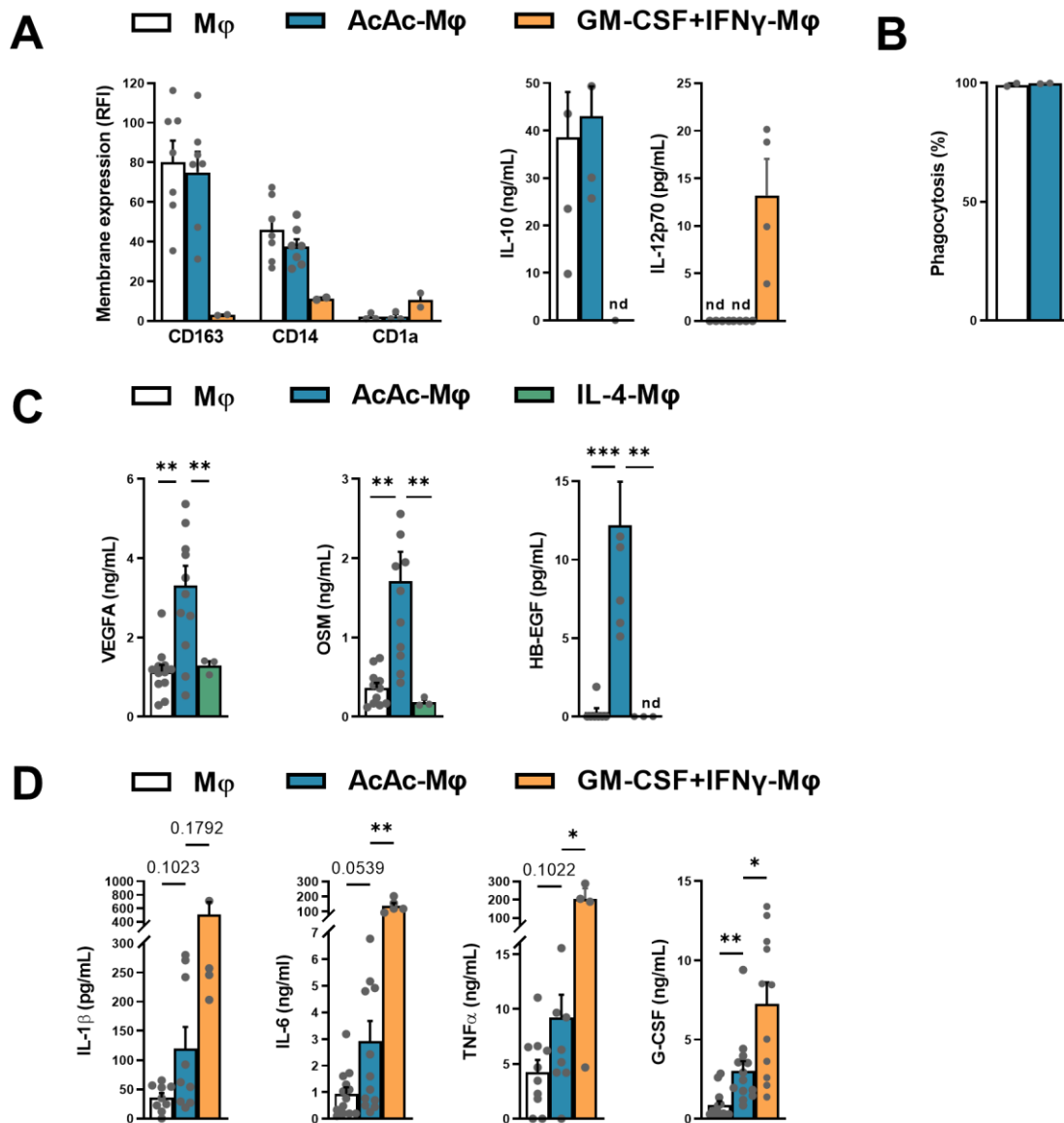


Figure 1. AcAc-Mφ exhibit a wound healing phenotype. Monocytes were cultured for 5 days with M-CSF (Mφ), M-CSF plus 5 mM AcAc (AcAc-Mφ), GM-CSF plus IFN γ (GM-CSF + IFN γ -Mφ) or M-CSF plus IL-4 (IL-4-Mφ). **A.** CD163, CD14 and CD1a expression were analyzed by flow cytometry and IL-10 and IL-12p70 were quantified after 48 h stimulation with LPS. **B.** Phagocytosis was analyzed by flow cytometry. **C-D.** Day-5 Mφ were stimulated for 48 h with LPS before quantification of VEGFA, OSM and HB-EGF (**C**), IL-1 β , IL-6, TNF α and G-CSF (**D**) in cell culture supernatants. **A-D.** mean \pm SEM (n=7-10); * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (One way Anova test); nd, not detected.

More precisely, AcAc-Mφ exhibited an early upregulation of the mRNA encoding the inflammatory cytokines *IL-1 β* , *IL-6*, *CCL2* and *CXCL5* between 6 h and 24-48 h before

returning to basal levels at 48 h (Fig. 2B). The expression of *VEGFA* and of *TNC* was significantly increased at 48-72 h (Fig. 2B) and the expression of transcripts encoding genes involved in cell migration and tissue remodeling, such as *TNC*, *OSM*, *PLAU*, and of the metalloproteinases *MMP1* and *MMP9* was increased in AcAc-M ϕ at day 5-7 (Fig. 2A-B and Supplemental Fig. S1).

AcAc also potentiated the production of *VEGFA*, *G-CSF* and *OSM* by M ϕ generated in the presence of M-CSF + IL-4 (prototypic M2) or GM-CSF + IFN γ (prototypic M1), showing that its capacity to potentiate cytokine production by human M ϕ is not dependent on the polarization cytokines (Supplemental Fig. S2). Studies have reported that the production of cytokines by human M ϕ is dependent on glucose availability (Hu *et al*, 2018). Results showed that the ability of AcAc to modulate the phenotype of human M ϕ was equivalent when generated in Glc^{lo} or Glc^{hi} mediums (Supplemental Fig. S3).

Collectively, these results demonstrated that *in vitro* generated human M ϕ acquired a wound healing phenotype upon exposure to AcAc.

AcAc-M ϕ differ from IL-4-M ϕ .

M ϕ polarized *in vitro* with IL-4 are usually defined as wound-healing cells. We therefore compared the cytokine profiles of AcAc-M ϕ and M ϕ generated in the presence of IL-4 (IL-4-M ϕ). As expected, activated IL-4-M ϕ produced *VEGF* and *OSM*, although at a lower level than AcAc-M ϕ (Fig. 1C). However, and contrary to AcAc-M ϕ , IL-4-M ϕ did not produce *HB-EGF* (Fig. 1C). Compared to IL-4-M ϕ , AcAc-M ϕ expressed lower levels of *dectin-1* and *CD206* and of the mRNA encoding the IL-4-induced molecules *TGM2*, *KIAA1671*, *CCL18*, *CCL22* and *CCL26* (Supplemental Fig. S4). Contrastingly, AcAc-M ϕ , but not IL-4-M ϕ , expressed the mRNA encoding *IL-1 α* (Fig. 1A) and *GM-CSF* (Supplemental Fig. S4).

These results showed that AcAc-M ϕ are distinct from IL-4-M ϕ .

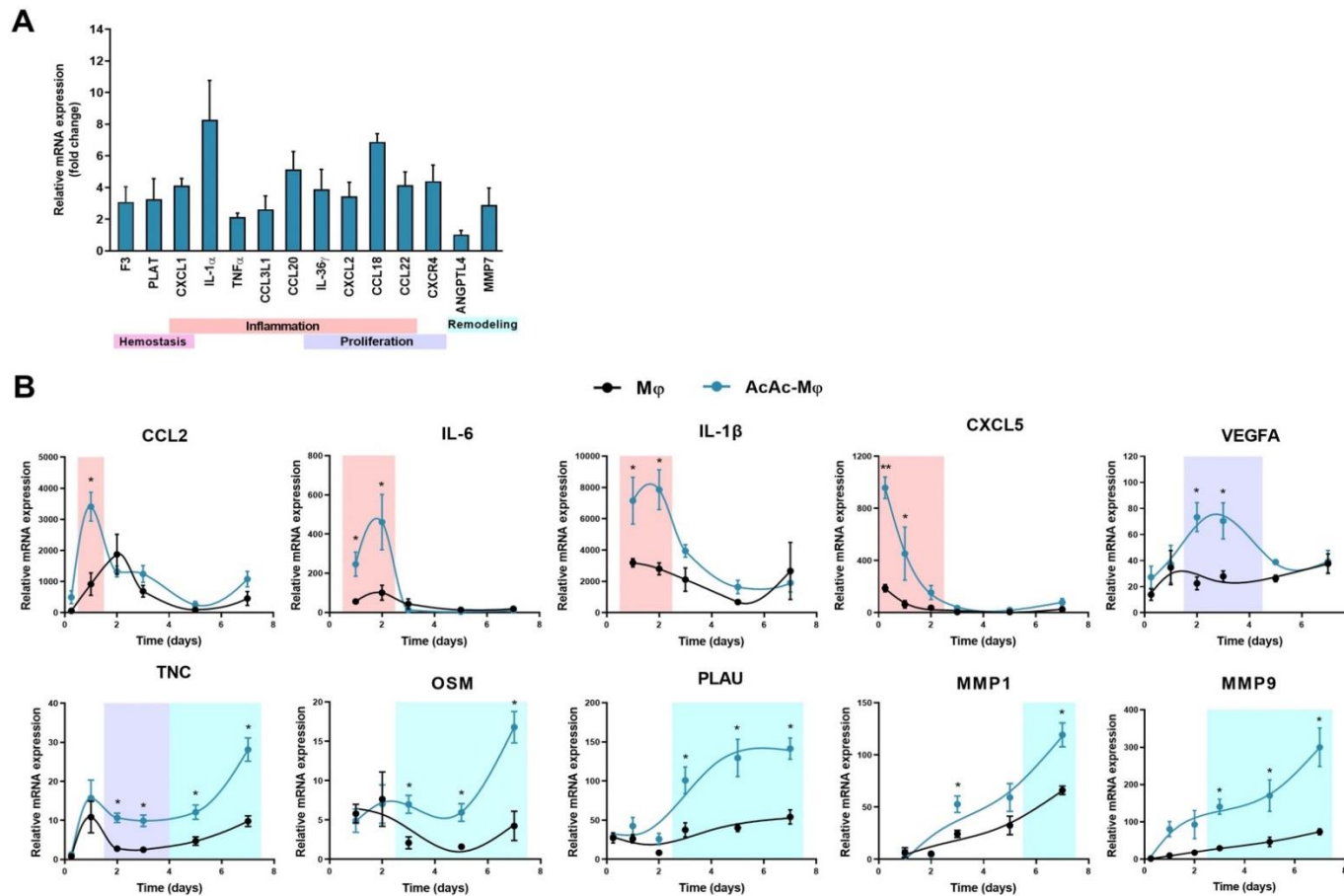


Figure 2. AcAc-Mφ acquire a wound healing phenotype. A. The expression of mRNA encoding F3, CXCL1, PLAT, CCL2, CCL3L1, CCL20, CXCL9, MMP7, IL-36 γ , CXCL2, CXCR4, CCL18, CCL22 and, ANGPTL4 by day-5 AcAc-Mφ and Mφ stimulated for 6 h with LPS was assessed by qPCR. Results are expressed as a relative mRNA expression in AcAc-Mφ versus Mφ (n=4). **B.** Monocytes were cultured for 7 days with M-CSF in the absence (Mφ) or presence of AcAc (AcAc-Mφ). The relative expression of mRNA encoding CCL2, IL-6, IL-1 β , CXCL5, VEGFA, PLAU, TNC, MMP1, MMP9 and, OSM was assessed by qPCR after a 6 h stimulation with LPS at the indicated times. **A, B.** Mean \pm SEM (n=4); * p<0.05 (Two-way Anova test).

The phenotype induced by AcAc is dependent on its metabolism.

AcAc is a fuel for myeloid cells . Accordingly, M ϕ expressed the mRNA encoding *SCOT* and *ACAT1*, the two key enzymes involved in AcAc oxidation (Supplemental Fig. S5). In agreement with the fact that β -OHB did not modulate the phenotype of differentiating M ϕ , human M ϕ expressed low or no *BDHI* mRNA (Supplemental Fig. S5), the enzyme involved in the oxidation of β -OHB into AcAc.

We then evaluated whether AcAc metabolism was required to induce M ϕ polarization. Results showed that AcAc was taken up by monocytes during their differentiation as evidenced by a decrease of extracellular AcAc concentrations (Fig. 3A) and a reduction of AcAc consumption in the presence of the MCT inhibitor CHC (Fig. 3B). Of note, the concentration of AcAc decreased in cell-free culture medium maintained at 37°C (Fig. 3A), a drop that may result from its conversion into acetone through decarboxylation, as previously reported (McNeil *et al*, 2014; Fritzsche *et al*, 2001). We next evaluated the impact of inhibiting the mitochondrial thiolase ACAT1, which oxidizes AcAc-CoA to acetyl-CoA (Supplemental Fig. S6)(Newman & Verdin, 2014). The ACAT1 inhibitor arecoline reduced the level of *IL-6*, *IL-1 β* , *CXCL5*, *G-CSF*, *VEGFA* and *TNC* mRNA expression produced by AcAc-M ϕ (Fig. 3C). In addition, silencing ACAT1 and SCOT expression significantly decreased the production of VEGFA and MMP1 by AcAc-M ϕ at 48 h, compared with control siRNA (Fig. 3D-E). As a control, siRNA targeting ACAT1 and SCOT decreased *ACAT1* and *SCOT* mRNA expression (Fig. 3D-E).

The mitochondrial catabolism of AcAc generates succinate and acetyl-CoA that can be oxidized within the TCA cycle (Supplemental Fig. S6), thereby supplying substrates to the TCA cycle (Newman & Verdin, 2014) and increasing mitochondrial respiration and biogenesis (Frey *et al*, 2017; Denoon *et al*, 2020; Adam *et al*, 2021). We then compared the mitochondrial respiration of M ϕ and AcAc-M ϕ . As expected, AcAc-M ϕ exhibited enhanced oxidative metabolism and basal respiration (Fig. 3F); ATP-linked respiration and maximum respiratory capacity were significantly elevated in AcAc-M ϕ compared to M ϕ (Fig. 3G).

Collectively, these results demonstrated that the metabolism of AcAc was required for the generation of AcAc-M ϕ .

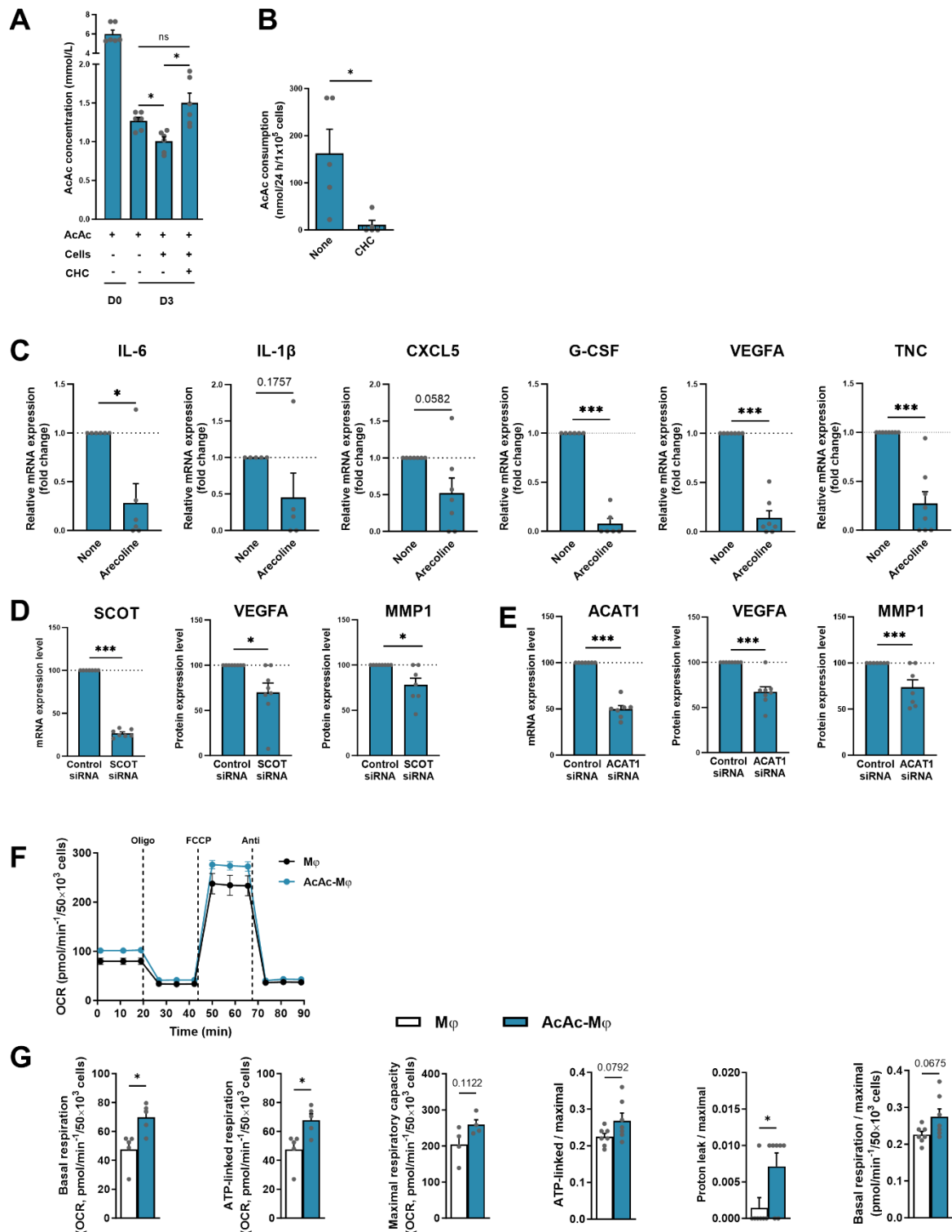


Figure 3. The wound healing phenotype induced by AcAc is dependent on its metabolism. **A, B.** Monocytes were cultured for 3 days with M-CSF and AcAc in the absence or presence of CHC and the concentration of AcAc was determined in the cell culture supernatants and in cell-free medium. Results are expressed as AcAc concentration (**A**) and as AcAc consumption (**B**) (n=6). **C.** The expression of mRNA encoding IL-6, IL-1 β , CXCL5, G-CSF, VEGFA and TNC by M ϕ cultured with 5 mM AcAc in the absence or presence of arecoline was determined by RT-qPCR at 24 h or 36 h (n=5-8). Results are expressed as a relative mRNA expression.

D,E. Monocytes were transfected for 48 h with siRNA targeting SCOT or ACAT1 mRNA or control siRNA before stimulation with LPS. SCOT and ACAT1 mRNA expression was analyzed by qPCR. VEGFA and MMP1 were quantified in culture supernatants by ELISA. Results are expressed as a percentage of protein expression. **F.** OCR measurement in AcAc-M ϕ and M ϕ before and after sequential addition of oligomycin (oligo), FCCP and antimycin A (Anti) (n=7). **G.** The ratio ATP-linked respiration/maximal respiratory capacity (ATP-linked/maximal), proton leak/maximal respiratory capacity and the basal respiration/maximal respiratory capacity were determined (n=4-7) **A-G.** Mean \pm SEM; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (One way Anova test and One sample t test).

The AcAc-induced M ϕ polarization is mediated by α -ketoglutarate.

The sequential expression of transcripts induced by AcAc suggested an epigenetic regulation. α -ketoglutarate (α -KG), a downstream AcAc metabolite (Supplemental Fig. S6), is an epigenetic regulator, acting as a cofactor for histone demethylases (Tran *et al*, 2019; Loenarz & Schofield, 2008). We thus suspected that the AcAc-induced M ϕ phenotype was mediated via α -KG. In a first set of experiments, we evaluated the capacity of the cell-permeable analog dimethyl- α -KG (DM- α KG) to mimic AcAc. Results showed that DM- α -KG induced a cytokine profile similar to AcAc-M ϕ , as illustrated by an increase of *IL-6*, *IL-1 β* , *CXCL5*, *VEGFA* and *G-CSF* mRNA expression (Supplemental Fig. S6). To confirm that the phenotype induced by AcAc was mediated through α -KG synthesis, we evaluated the consequence of inhibiting α -KG metabolism in AcAc-M ϕ . Surprisingly, results showed that oxalomalate (OM), an inhibitor of isocitrate dehydrogenase (IDH) (Supplemental Fig. S6), increased the expression of the mRNA encoding *CXCL5*, *IL-1 β* , *IL-6*, *G-CSF*, *VEGFA* and *TNC* (Fig. 4A). This result may be explained by a preferential use of the malate-aspartate shuttle via the enzymes GOT1 and/or GOT2 that constitute an alternative α -KG synthesis pathway upstream IDH (Supplemental Fig. S6). In agreement with this hypothesis, the malate-aspartate shuttle inhibitor AOAA decreased the expression of *CXCL5*, *IL-1 β* , *IL-6*, *G-CSF*, *TNC* and *VEGFA* mRNA expression by AcAc-M ϕ , even in the presence of OM (Fig. 4A). Moreover, silencing GOT1 expression significantly decreased VEGFA and MMP1 by AcAc-M ϕ at 48 h (Fig. 4B); siRNA targeting GOT1 decreased GOT1 mRNA expression (Fig. 4B). α -KG can also be produced by glutaminolysis (Stillman *et al*, 1993). Results showed that the ability of AcAc to modulate the phenotype of human M ϕ was equivalent when generated with or without glutamine (Supplementary Fig. S3). These results demonstrated that the capacity of AcAc to modulate the phenotype of M ϕ was dependent on the synthesis of α -KG via the malate-aspartate shuttle.

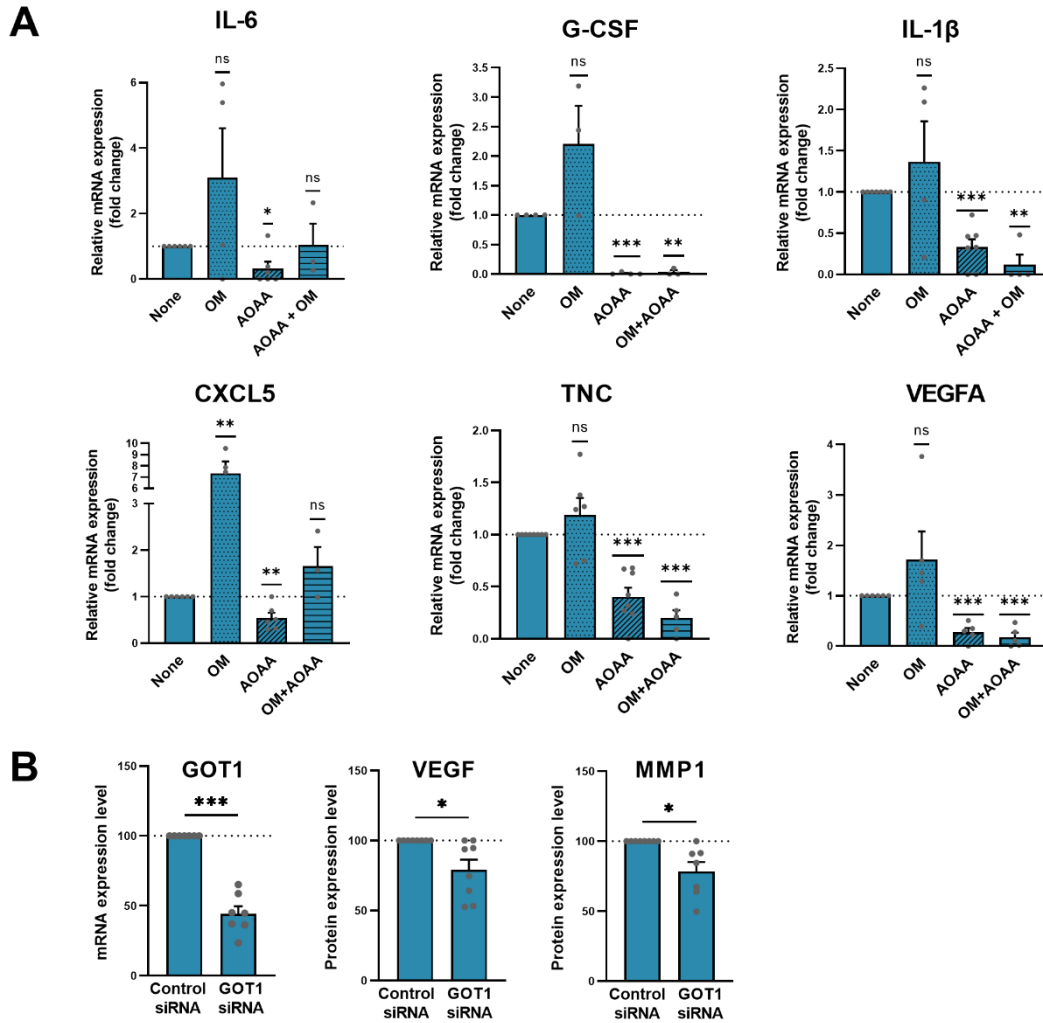


Figure 4. The impact of AcAc on Mφ requires its metabolization. A. Monocytes were cultured for 24, 36 or 48 h with M-CSF plus 5 mM AcAc, in the absence or presence of oxalomalate (OM) and/or aminoxyacetic acid (AOAA). The expression of the mRNA encoding IL-6, G-CSF, IL-1β, CXCL5, TNC and VEGFA after a 6 h stimulation with LPS was analyzed by RT-qPCR. Results are expressed as a relative mRNA expression by cells cultured without and with the inhibitors (n=3-8). **B.** Monocytes were transfected siRNA targeting GOT1 mRNA or control siRNA before a stimulation with LPS. GOT1 mRNA expression was analyzed by qPCR. VEGFA and MMP1 were quantified in culture supernatants by ELISA. Results are expressed as a percentage of protein expression (n=7-8). **A,B.** Mean ± SEM * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (One sample t test).

AcAc regulates gene expression via H3K27 methylation.

α -KG activates Jmjd3, a histone demethylase which catalyzes the demethylation of trimethyl H3K27 (H3K27me₃), a repressive epigenetic mark (Liu et al, 2017). We thus suspected that the capacity of AcAc to regulate the expression of selected mRNA was mediated through the regulation of Jmjd3 expression. AcAc-M ϕ expressed elevated levels of *Jmjd3* mRNA compared to M ϕ (Fig. 5A) while the expression of the mRNA encoding *UTX*, another H3K27 demethylase, and of *EZH2*, a histone methyltransferase (Yoo & Hennighausen, 2011), was equivalent in both cell populations (Supplemental Fig. S6). Interestingly, Jmjd3 converts α -KG to succinate, a Jmjd3 inhibitor (Carey *et al*, 2015). Accordingly, the α -KG/succinate ratio, which controls α -KG-dependent dioxygenases, including Jmjd3 (Kaelin, 2011), was elevated in AcAc-M ϕ compared with M ϕ (Fig. 5B). Moreover, AOAA reduced the expression of Jmjd3 (Fig. 5C) and GSK-J4, a cell-permeable UTX and Jmjd3 inhibitor, prevented the increase of *CXCL5*, *IL-1 β* , *IL-6*, *G-CSF*, *TNC* and *VEGFA* mRNA expression in AcAc-M ϕ at 36 h and of *OSM* and *MMP1* mRNA expression at day 7 (Fig. 5D). Finally, we analyzed the level of H3K27 methylation of selected gene promoters in day-1 AcAc-M ϕ . Results revealed an increase of H3K27me₁ level at the *IL-1 β* , *IL-6* and, at a lower extent, *VEGFA* promoter, compared to M ϕ (Fig. 5E).

Collectively, these results showed that the AcAc-M ϕ phenotype was dependent on α -KG-mediated epigenetic regulation.

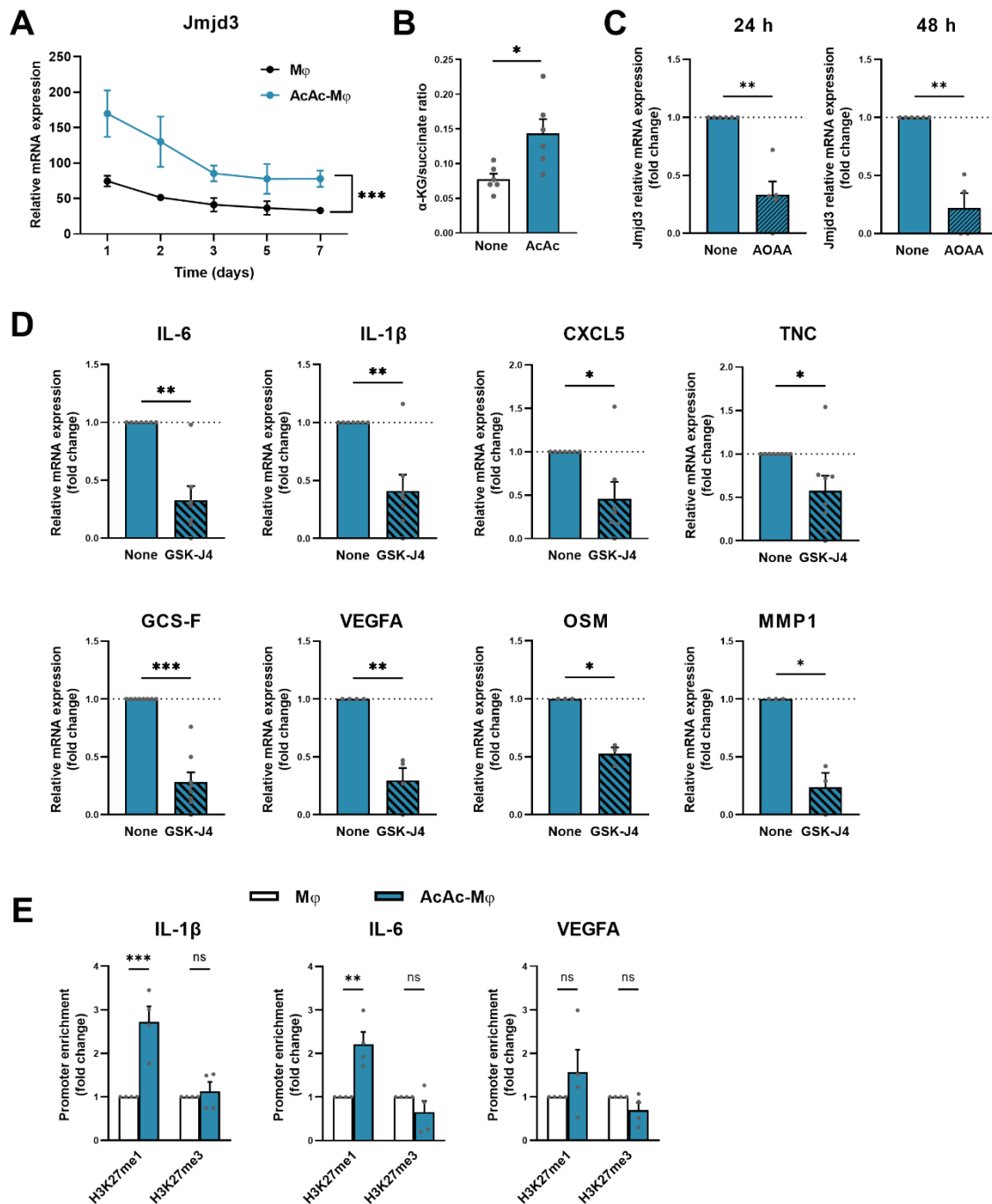


Figure 5. AcAc acts by regulating H3K27 methylation on the promoter of target genes. A. Day-7 M ϕ and AcAc- M ϕ were stimulated with LPS for 6 h and the expression Jmjd3 was assessed by RT-qPCR at the indicated times. Results are expressed as a relative level of mRNA expression (n=6). **B.** The intracellular α KG/succinate ratio was determined in cells cultured with or without AcAc for 3 days (n=6). **C.** The expression of Jmjd3 mRNA was evaluated by RT-qPCR in monocytes cultured for 24 h or 48 h without or with AcAc and after a 6 h stimulation with LPS (n=4-5). **D.** Monocytes were cultured with M-CSF plus AcAc in the absence or presence of the Jmjd3 inhibitor GSK-J4. The expression of the mRNA encoding IL-6, IL-1 β , CXCL6, TNC, G-CSF and VEGFA was determined at 36 h (n=4-8) and the expression of MMP1 and OSM was determined on day 7 by RT-qPCR and after a 6 h stimulation with

LPS (n=3). **C,D.** Results are expressed as a relative mRNA expression in treated vs non treated cells. **E.** ChIP assay was performed using anti-H3K27me1 and anti-H3K27me3 Abs and their occupancy was determined by qPCR at the indicated gene promoters (n=4). **A-E.** Mean \pm SEM; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Welch t-test, One sample t test and Two-way Anova test).

Ketogenic diet accelerates skin wound healing.

We next evaluated the *in vivo* impact of a ketogenic diet on skin wound healing. In preliminary experiments, we verified that a ketogenic diet (KD), but not a standard diet (SD), was associated with an increase of circulating AcAc and β -OHB levels (Supplemental Fig. S7). We also verified that KD did not impact skin architecture (Fig. 6A) or the frequency of resident M ϕ subsets (Supplemental Fig. S8).

After 30 days on KD or SD, mice underwent surgical removal of 1 cm² skin in the dorsal side and the healing was monitored for 21 days. Results showed that wound closure was significantly faster at day 2, 3, 4 and 5 in mice fed KD than in mice fed SD (Fig. 6B). Tissue analysis showed that healed tissue in KD mice was similar to SD fed mice at day 10 (Fig. 6A) and day 20, without signs of fibrosis (Fig. 6A and Supplemental Fig. S7). Moreover, the epidermal thickness was equivalent in both groups (Fig. 6A and Supplemental Fig. S7).

We then evaluated whether the impact of KD on skin healing may be associated with M ϕ reprogramming. In a first set of experiments, we verified that murine M ϕ acquired a wound healing phenotype upon *in vitro* exposure to AcAc. As expected, AcAc induced the differentiation of BMDM into M ϕ expressing elevated levels of mRNA encoding *PLAT* (hemostasis), *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF α* , *CCL2* (inflammation), *HB-EGF*, *IL-36 γ* , *G-CSF*, *TNC* (proliferation) and of *VEGFA*, *MMP9* and *OSM* (remodeling) (Supplemental Fig. S8). We then analyzed the profile of F4/80⁺ M ϕ isolated from healed tissues. Flow cytometry analysis revealed that (i) the levels of *CD11c* and *CD206* were similar in mice fed KD or SD (before skin removal) (Supplemental Fig. S8) and (ii) that the frequencies of skin-infiltrating CD11c⁻ CD206⁻ M0, CD11c⁺ CD206⁻ M1 and CD11c⁻ CD206⁺ M2 cells were equivalent in both groups during the healing process (Fig. 6C). A transcriptomic analysis of skin-infiltrating M ϕ revealed that the expression of *IL-1 β* was decreased in M ϕ collected at D1-D3 and D7-10 in KD *versus* SD fed mice and that the expression of *MMP9* was increased at D1-D3 in KD *versus* SD fed mice (Fig. 6D). Finally, the expression of *PLAT*, *TNC* and *MMP9* mRNA tended to be also increased at D7-D10 (Fig. 6D).

Collectively, these results showed that KD improved skin healing and that this effect was associated to an increase in the expression of molecules involved in tissue repair by skin infiltrating M ϕ .

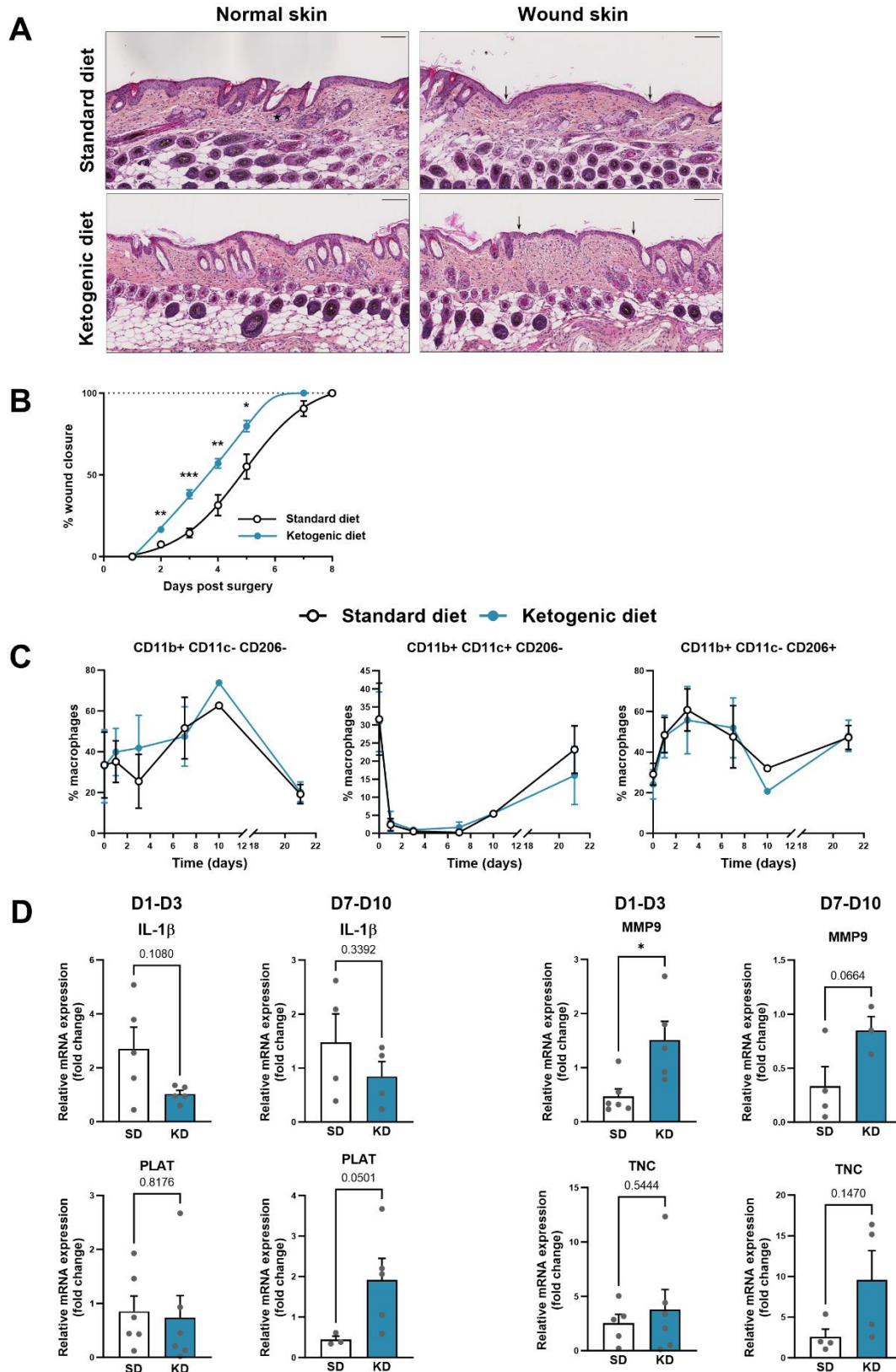


Figure 6. Ketogenic diet and cutaneous application of AcAc accelerate skin healing. Mice were fed ketogenic diet (KD) or standard diet (SD) for one month before surgical skin wound or underwent surgical wound and AcAc or PBS were applied daily on wounds (C). A. Hematoxylin/eosin (H&E) staining of dorsal skin biopsy sections from normal skin (left panel)

and 10 days after injury (right panel) of mice fed standard (SD) (upper panels) or ketogenic (KD) diet (lower panels). Arrows demark the wound edge. Scale bar, 100 μ m. **B**. Wounds were photographed at different time points and the wound area was measured daily (n=10 or 14). Results are expressed as the percentage of closure relative to original size. **C,D**. M ϕ were isolated from the skin of mice fed SD or KD. **C**. Flow cytometry analysis of membrane CD11b, CD11c and CD206 expression by M ϕ isolated from skin from D0 to D21. Results are expressed as a percentage of M ϕ subtypes (n=3; each point representing a pool of three mice). **D**. The relative expression of the mRNA encoding IL-1 β , PLAT, MMP9 and TNC was assessed by RT-qPCR in M ϕ isolated at D1-D3 or D7-D10 post-injury (n=4-5; each point representing a pool of three mice). **B,D**. Mean \pm SEM * p<0.05; **p < 0.01; *** p < 0.001 (Welch t-test and Two-way Anova test).

Discussion

Ketone bodies constitute an alternative source of energy for all tissues during periods of low carbohydrate availability, such as fasting or a ketogenic diet (Puchalska *et al*, 2018). The ketogenic diet has received a lot of attention in recent years because of its beneficial role in many pathologies (cancer, type 2 diabetes, neurodegenerative and cardiac diseases) (Zhu *et al*, 2022). However, the potential beneficial effect of ketone bodies in wound healing has not been investigated. Here, we demonstrate that M ϕ generated in the presence of the ketone body AcAc display a healing profile with the expression, in a time-dependent manner, of genes involved in the three phases of the wound healing process. AcAc-M ϕ exhibit an inflammatory profile at early times before switching to a healing profile at later times. This effect is associated with H3K27 methylation on the promoters of target genes. Finally, a ketogenic diet accelerates wound healing *in vivo*, and this process is accompanied by the presence of M ϕ exhibiting a healing profile.

We report, for the first time, that the metabolism of the nutrient AcAc (i) promotes the *in vitro* generation of M ϕ with a tissue repair phenotype and, (ii) accelerates wound healing. As previously observed, monocytes/M ϕ weakly express BDH1, explaining why β -OHB poorly affected human M ϕ phenotype (Puchalska *et al*, 2019; Adam *et al*, 2021).

M ϕ are pivotal in each phase of the tissue repair process and their function evolves during wound healing (Minutti & Knipper, 2017). At the onset of the wound-healing process, M ϕ predominantly display an M1 inflammatory profile, which is then progressively shifted to an M2 profile during the cell proliferation and tissue remodelling phase. The signals involved in this sequential polarization remain poorly understood. Endogenous or exogenous inflammatory signals (released by dead cells and/or expressed by microbes) promote M1 cells, while cytokines, such as IL-10, IL-4 or IL-13, and efferocytosis, promote M2 polarization (Mosser & Edwards, 2008; Wynn & Vannella, 2016). Although M2 M ϕ generated *in vitro* in the presence of IL-4 or IL13 are often considered the prototypic wound healing M ϕ , their involvement in the tissue repair process remains controversial, as the healing process is not affected in IL-4R-deficient mice (Daley *et al*, 2010).

The origin of M ϕ subtypes in the healing process remains unclear. Do they derive from the differentiation of monocytes into M1 or M2 cells depending on the microenvironment they encounter at the time of recruitment or do they originate from a switch from M1 into M2 cells

depending on the modification of signals produced locally by stroma cells. To date, a switch from M1 to M2 cells has not been reported while, in contrast, several studies have demonstrated the reprogramming of M2 into M1 cells (Georgoudaki *et al*, 2016; Kashfi *et al*, 2021).

Our results revealed that AcAc-M ϕ acquire M1 and M2 cell markers in a time-dependent manner, suggesting that AcAc metabolism leads to epigenetic regulation. Epigenetic regulation is a key molecular process allowing M ϕ to adapt to their environmental signals, and in particular to metabolic modifications (Baardman *et al*, 2015; Noe *et al*, 2021). AcAc feeds the TCA and stimulates mitochondrial respiration and biogenesis (Frey *et al*, 2017; Denoon *et al*, 2020; Adam *et al*, 2021). Our results show that AcAc metabolism induces an elevated α -KG/succinate ratio, which constitutes an activation signal for the histone demethylase Jmjd3 that modulates H3K27 methylation. We demonstrate that Jmjd3 controls both M1 and M2 characteristics of AcAc-M ϕ . Supporting this observation, in wound human epidermal keratinocytes, activated Jmjd3 triggers the expression of inflammatory genes (IL-1 β , IL-6, TNF α), metalloproteases and growth factors (HB-EGF, HGF) (Na *et al*, 2016). Jmjd3 activation in myeloid cells, notably via α -KG (Liu *et al*, 2017), has been reported to favor M2 polarization by modulating H3K27 methylation at the promoters of M2 marker genes (such as IRF4) (Ishii *et al*, 2009; Satoh *et al*, 2010) and to increase inflammatory gene expression (Davis *et al*, 2020; Audu *et al*, 2022).

In addition to histone methylation, histone acetylation is also involved in M ϕ polarization (Shakespear *et al*, 2011; Hoeksema *et al*, 2014). Although β -OHB inhibits class I histone deacetylase (HDAC) (Shimazu *et al.*, 2013) and modulates histone acetylation in CD8⁺ T cells (Luda *et al.*, 2023), whether AcAc may also modulate histone acetylation remains to be demonstrated.

Finally, all cell types, such as muscles (Zou *et al*, 2016; Zhong *et al*, 2021) and epithelial cells (Denoon *et al*, 2020), and except hepatocytes, can metabolize AcAc. One can hypothesize that AcAc metabolism may also favor the acquisition of a tissue repair phenotype by fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes that actively participate to the wound healing process. In support, the activation of Jmjd3 confers to human keratinocytes a profile similar to AcAc-M ϕ (Na *et al*, 2016).

Ketone bodies are synthesized by the liver during fasting. Studies suggest that anorexia and fasting during acute infection may constitute a behaviour conserved across species to increase tissue tolerance to acute infections (Medzhitov *et al*, 2012; Wilhelm *et al*, 2021). Fasting-

associated metabolism increases tissue resistance to oxidative stress during bacterial inflammation (Wang *et al*, 2016) and the liver growth factor FGF21, which expression is induced by AcAc, regulates thermogenesis and promotes survival during bacterial inflammation (Huen *et al*, 2021). Reinforcing the beneficial role of ketone bodies in tissue resistance, we previously observed that AcAc metabolism promotes cell resistance to acidosis-induced stress by restoring their mitochondrial function (Adam *et al*, 2021). Here, we provide a new mechanism that may help to explain how ketone bodies promote tissue resistance to stress.

The ability of AcAc to improve tissue repair of a limited lesion that does not lead to anorexia or fasting (avoiding ketogenesis) allows to speculate on a possible local synthesis of ketone bodies. Although ketone bodies synthesis by cells other than hepatocytes has not yet been demonstrated, the expression of the HMGCS2 enzyme by extrahepatic cells, such as endothelial cells, colon enterocytes, cardiomyocytes, CD8+ T memory cells (Zhang *et al*, 2020; Cheng *et al*, 2022; Weis *et al*, 2022) and mouse skin (personal unpublished observation), is in favor of extrahepatic ketogenesis.

Our results showed that the application of AcAc may represent a therapeutic alternative in pathological situations characterized by a dysregulated tissue repair by restoring and/or accelerating wound healing, such as in diabetic wounds, fibrosis or severe burns (Raziyeva *et al*, 2021). In agreement with this hypothesis, M ϕ play a central role in diabetic wound healing, and therapies that promote M2 generation are suspected to accelerate healing (Mirza *et al*, 2013; Wang *et al*, 2017; Sharifiaghdam *et al*, 2022). Indeed, throughout the diabetic wound healing, M ϕ retain a prominent inflammatory phenotype due to a chronic inflammation induced by hyperglycemia and these inflammatory cytokines prevent the generation of M2 cells (Huang *et al*, 2019; Louiselle *et al*, 2021), slowing healing. Burns are also associated with a hypermetabolic response with a strong increase of lactate production (Gore *et al*, 2000, 2001) and glucose concentration, that represent risk factors of infection and sepsis. In both situations, AcAc should reduce glycolysis, but also enable M ϕ to switch from an inflammatory to a healing phenotype, ensuring optimal wound healing. Finally, M ϕ play an essential regulatory role the fibrosis process through the expression of pro- and anti-fibrotic mediators (Wynn & Barron, 2010). We observed a decrease of pro-fibrotic gene expression in AcAc-M ϕ . In agreement with our observations, Puchalska *et al*. reported that AcAc metabolism by M ϕ decreases hepatic fibrosis (Puchalska *et al*, 2019), suggesting that AcAc could also be used to dampen fibrosis.

In conclusion, our study shows that (i) AcAc constitutes a crucial metabolite to induce the generation of a M ϕ subtype exhibiting a unique wound healing phenotype and (ii) that AcAc represents a potential therapeutic target to facilitate healthy repair of injured tissue. This natural and non-toxic molecule seems to have a strong therapeutic interest in pathologies associated with massive tissue damage.

Materials and Methods

Isolation of human monocytes and generation of M ϕ .

Blood from healthy subjects were obtained from the blood collection center (EFS Pays de la Loire, Angers, France; agreement ANG-2017-01). In accordance with French regulations, we only had access to blood from donors who had given their consent for research use; the samples were anonymized and limited information on donors was given (age 18-70; weight >50 kg; no active infectious, neoplastic, hemostatic or vascular disease). Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by standard density-gradient centrifugation on Lymphocyte Separation medium (Eurobio Scientific, Les Ulis, France). Monocytes were isolated from PBMC by positive selection using anti-CD14 mAb-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); purity was >99%. Monocytes (1×10^6 cells/mL) were cultured for 7 days in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) containing low glucose (Glc^{lo}; 0.5 g/L), supplemented with 10% FCS (Eurobio Scientific) and 50 ng/mL M-CSF (ORF genetics, Kópavogur, Island), and containing or not 5 mM AcAc (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). In some experiments, cells were cultured in the presence of 125 mM α -cyano-4-hydroxycinnamate (CHC), 250 mM arecoline, 5 mM GSK-J4, 5 mM aminooxyacetic acid (AOAA) (all from Sigma-Aldrich) or 1 mM oxalomalate (OM ; Cayman chemicals, Ann Arbor, MI). All inhibitors were used at the highest nontoxic concentration. Prototypic M2 cells (IL-4-M ϕ) (Hickman et al., 2023) were generated by culturing monocytes in complete medium containing 50 ng/mL M-CSF for 5 days before addition of 50 ng/mL IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) for two days. Prototypic M1 cells (Hickman et al., 2023) were generated by culturing monocytes for 3 days with 50 ng/mL GM-CSF (R&D Systems) before addition of 50 ng/mL IFN γ for 2 days. In some experiments, M ϕ were stimulated for 24 h with 100 ng/mL LPS (from *Escherichia coli* serotype O111:B4 ; Sigma-Aldrich).

Flow cytometry analysis.

Cell viability was monitored using the LIVE/DEAD fixable Near-IR Dead cell staining kit (Beckman Coulter, Pasadena, CA). Data were acquired using the CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed with the FlowJo software (v10.7.1 ; Becton Dickinson). Results are expressed as relative fluorescence intensity (RFI) defined as the ratio of specific fluorescence (mean fluorescence intensity (MFI) values with specific mAbs) to nonspecific fluorescence (MFI values with isotype control mAbs). The antibodies used were the following: PE-labeled anti-human CD14 (ref 130-091-242; Milteniy biotec), APC-labeled anti-human

CD163 (ref FAB1607A; R&D Systems), FITC-labeled anti-human CD45 (ref 555806; Biolegend, San Diego, CA), PE-labeled anti-mouse CD11b (ref 553311; BD Biosciences, San Jose, CA), PerCP Cy5.5-labeled anti-mouse F4/80 (ref 123127; Biolegend), BV421-labeled anti-mouse CD11c (ref 117330; Biolegend) and APC-labeled anti-mouse CD206 (ref 141708; Biolegend).

Phagocytosis assay.

Phagocytosis of using *Staphylococcus aureus* fluorescein conjugate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was analyzed by flow cytometry. Briefly, M ϕ were incubated with opsonized *S. aureus* for 2 h at 37°C (1:20 ratio). After washing, cells were incubated with TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific) to discriminate dead cells from live cells. Results are expressed as the percentage of cells that have phagocytosed at least one bacteria.

Cytokine quantification.

Human IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF α (Diaclone, Besançon, France), VEGF-A, OSM, HB-EGF, G-CSF and MMP1 (R&D Systems) were quantified using commercial ELISA, according to the manufacturer recommendation.

RT-qPCR analysis.

After cell lysis using the Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific), total RNA was extracted using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed using the Superscript II reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). The expression of the indicated mRNA was analysed by qPCR. Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Vandesompele *et al*, 2002) using *RPS18*, *EF1A*, *TBP* (for human genes), *ACTB* and *β 2M* (for mouse genes) as references. The calculation method is based on the conversion of the linear Cq values into a logarithmic scale using the efficiency of PCR as an exponential function. The geometric mean of selected housekeeping genes is used as a normalization factor, allowing eliminating inter-sample variations. Results are expressed as relative mRNA levels.

Metabolite quantification.

The concentration of AcAc in cell culture supernatants and serum were determined using β -hydroxybutyrate dehydrogenase (Roche Applied Science) that catalyzes the reversible reduction of AcAc to β -hydroxybutyrate in the presence of an excess of NADH, with the concomitant oxidation of NADH. Results are expressed in mmol/L or as a rate of consumption

(mmol/24 h). Alpha-ketoglutarate (α -KG) and succinate were quantified by mass spectrometry coupled to liquid chromatography (Q Exactive Orbitrap; Thermo Fischer Scientific). Chromatographic elution was performed on a Luna Omega Polar C18 column (Phenomenex, Torrance, CA) at 300 μ L/min with a phase A of ultrapure water (H_2O) and a phase B of methanol (MeOH), each containing 0.1% formic acid. The gradient program was as follows: after 2 min equilibration at 2% phase B, the gradient reached 100% at 17 min and remained at this percentage for 3 min before returning to initial conditions. Metabolites were extracted with 600 μ L ice-cold MeOH/ H_2O (80/20). Lysates were harvested and centrifuged at 13,800 \times g for 15 min to remove proteins. Extracts were dried and resuspended in 200 μ L H_2O /MeOH mixture (98/2). The oven temperature was set at 40°C and the injection volume at 5 μ L. All peaks were manually inspected and checked against known spectra for each metabolite. Results are expressed as an α -KG/succinate ratio.

Oxygen consumption rate.

The bioenergetic profile of M ϕ was determined using the XF96 analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Cells (50×10^3 cells/well) were seeded on plates and allowed to recover for 24 h. Cells were then incubated in bicarbonate-free DMEM medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 11 mM glucose, 2 mM L-glutamine, and 1 mM sodium pyruvate, in a CO_2 -free incubator for 1 h. Oxygen consumption rate (OCR) was recorded in basal conditions before a sequential treatment with 2 μ g/mL oligomycin and 3 μ M carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) (both from Sigma-Aldrich). Non-mitochondrial respiration (OCR after treatment with 1 μ g/mL antimycin A (Sigma-Aldrich) was subtracted from all OCR measurements. ATP-linked respiration was estimated from the difference between the basal and oligomycin-inhibited respiration rates, and proton-leak respiration was obtained by subtracting non-mitochondrial respiration from the OCR measured after oligomycin treatment. Maximal respiratory capacity was determined as the rate of respiration in the presence of the uncoupler FCCP. Three independent replicates of each measurement were generated, and results were normalized according to cell concentration.

RNA interference.

Short interfering RNA (siRNA) were used to decrease acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT1), succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase (SCOT) and glutamic-oxaloacetic transaminase 1 (GOT1) expression in human monocytes (Dharmacon, Lafayette, CO). The human monocyte nucleofector kit (Lonza, Verviers, Belgium) was used according to the

manufacturer's instructions. In brief, immediately after isolation, 4×10^6 monocytes were transfected with 100 nM ON-Target plus SMARTpool siRNA specific for *ACAT1*, *SCOT* or *GOT1* or with control siRNA. The expression of *ACAT1*, *SCOT* and *GOT1* was assessed by RT-qPCR.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assay was performed using the SimpleChIP[®] Enzymatic Chromatin IP Kit according to the manufacturer's instructions (Cell Signaling technologies, Danvers, MA). Briefly, 5×10^6 Mφ were fixed with 1% formaldehyde to cross-link histones to DNA. Chromatin was fragmented with the micrococcal nuclease (Cell Signaling technologies); 200-400 bp fragmentation was confirmed by agarose gel electrophoresis. After digestion, the chromatin was immunoprecipitated with anti-H3K27me1 (Sigma-Aldrich) or anti-H3K27me3 Ab (Cell Signaling technologies). Immunoprecipitated DNA and input DNA samples were quantified by qPCR and data are presented as promoter enrichment.

***In vivo* experiments.**

5-week-old female/male C57BL6 mice (Janvier laboratory, Le Genest Saint Isle, France) were housed in a specific pathogen-free environment in ventilated cages with water and fed with standard or a ketogenic diet (8.6% protein, 3.2% carbohydrate, 4.8% fiber, 75.1% fat ; Plexx, Amsterdam, The Netherlands). After 30 days of ketogenic or standard diet, mice were subjected to surgical full-thickness removal of 1 cm² skin in the dorsal region with incorporation of a splint around the wound to prevent closure by muscle contraction, in order to mimic human wound healing (epithelialization and granulation tissue formation rather than contraction). Wounds were monitored daily, and the wound area was determined by image analysis (ImageJ software). Skin biopsies (4 mm diameter) were collected at D0, D10, and D20 for histological analysis. Formalin-fixed and paraffin-embedded 5 μm thick tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Slides were digitalized using the Aperio ImageScope system (Leica Biosystems, Vista, CA) and analyzed in a blind manner. Protocols were approved by the institutional ethics committee of the Region Pays de la Loire and authorized by the French ministry of research (agreement A49007002; APAFIS#32028-2022042815182176v3).

Ex vivo analysis of murine M ϕ .

Skin M ϕ were isolated from 4 mm diameter skin fragments using the Whole Skin Dissociation kit and F4/80+ cells were isolated by positive magnetic cell sorting (both from Miltenyi biotech).

Bone marrow cells were isolated as described (Toda *et al*, 2021) and cultured with RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 5 μ M β -mercaptoethanol and 50 ng/mL M-CSF. Cells (1×10^6 cells/mL) were cultured for 5 days and the purity of M ϕ was determined by flow cytometry using anti-CD11b (Biolegend) and anti-F4/80 Ab (Invitrogen). Spleen M ϕ were isolated as previously reported (Bronte *et al*, 2003). After washing to remove non-adherent cells, adherent cells were washed before isolation with F4/80 mAb-coated magnetic beads on magnetic columns (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. F4/80+ cells were then stimulated for 6 h with 100 ng/mL LPS.

Statistical analysis.

All statistical analyses were performed with PRISM software version 9.5.0 (GraphPad Software Inc, Boston, MA) (<http://www.graphpad.com>) and expressed as means \pm SEM. Data were tested for normally distribution with the Shapiro-wilk normality test. The Student's unpaired two tailed t test and one sample t test were used to compare two conditions and Welch ANOVA followed by Dunnett's post hoc test was used for comparisons of more than two sets of conditions. The two-way ANOVA test was used to compare two kinetic conditions. P-value less than 0.05 were considered statistically significant and n indicates the number of independent biological replicates.

Bibliography

- Adam, C., L. Paolini, N. Gueguen, G. Mabileau, L. Preisser, S. Blanchard, P. Pignon, F. Manero, M. Le Mao, A. Morel, P. Reynier, C. Beauvillain, Y. Delneste, V. Procaccio, and P. Jeannin. (2021) Acetoacetate protects macrophages from lactic acidosis-induced mitochondrial dysfunction by metabolic reprogramming. *Nat Commun* 12, 7115.
- Audu, C.O., W.J. Melvin, A.D. Joshi, S.J. Wolf, J.Y. Moon, F.M. Davis, E.C. Barrett, K.D. Mangum, H. Deng, X. Xing, R. Wasikowski, L.C. Tsoi, S.B. Sharma, T.M. Bauer, J. Shadiow, M.A. Corriere, A.T. Obi, S.L. Kunkel, B. Levi, B.B. Moore, J.E. Gudjonsson, A.M. Smith, and K.A. Gallagher. (2022) Macrophage-specific inhibition of the histone demethylase JMJD3 decreases STING and pathologic inflammation in diabetic wound repair. *Cell Mol Immunol* 19, 1251–1262.
- Baardman, J., I. Licht, M.P.J. de Winther, and J. Van den Bossche. (2015) Metabolic-epigenetic crosstalk in macrophage activation. *Epigenomics* 7, 1155–1164.
- Bronte, V., P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, V. Tosello, A. Mazzoni, D.M. Segal, C. Staib, M. Lowel, G. Sutter, M.P. Colombo, and P. Zanovello. (2003) IL-4-Induced Arginase 1 Suppresses Alloreactive T Cells in Tumor-Bearing Mice¹. *The Journal of Immunology* 170, 270–278.
- Cahill, G.F. (2006) Fuel Metabolism in Starvation. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 1–22.
- Carey, B.W., L.W.S. Finley, J.R. Cross, C.D. Allis, and C.B. Thompson. (2015) Intracellular α -ketoglutarate maintains the pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 518, 413–416.
- Cheng, Y.-Y., Z. Gregorich, R.P. Prajnamitra, D.J. Lundy, T.-Y. Ma, Y.-H. Huang, Y.-C. Lee, S.-C. Ruan, J.-H. Lin, P.-J. Lin, C.-W. Kuo, P. Chen, Y.-T. Yan, R. Tian, T.J. Kamp, and P.C.H. Hsieh. (2022) Metabolic Changes Associated With Cardiomyocyte Dedifferentiation Enable Adult Mammalian Cardiac Regeneration. *Circulation* 146, 1950–1967.
- Daley, J.M., S.K. Brancato, A.A. Thomay, J.S. Reichner, and J.E. Albina. (2010) The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* 87, 59–67.
- Davis, F.M., A. denDekker, A.D. Joshi, S.J. Wolf, C. Audu, W.J. Melvin, K. Mangum, M. O’Riordan, S.L. Kunkel, and K.A. Gallagher. (2020) Palmitate-TLR4 Signaling Regulates the Histone Demethylase, JMJD3, in Macrophages and Impairs Diabetic Wound Healing. *Eur J Immunol* 50, 1929–1940.
- Denoon, T., S. Sunilkumar, and S.M. Ford. (2020) Acetoacetate enhances oxidative metabolism and response to toxicants of cultured kidney cells. *Toxicology Letters* 323, 19–24.
- Ding, J., and E.E. Tredget. (2015) The Role of Chemokines in Fibrotic Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 4, 673–686.

- Frey, S., G. Geffroy, V. Desquirit-Dumas, N. Gueguen, C. Bris, S. Belal, P. Amati-Bonneau, A. Chevrollier, M. Barth, D. Henrion, G. Lenaers, D. Bonneau, P. Reynier, and V. Procaccio. (2017) The addition of ketone bodies alleviates mitochondrial dysfunction by restoring complex I assembly in a MELAS cellular model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863, 284–291.
- Fritzsche, I., P. Bührdel, R. Melcher, and H.J. Böhme. (2001) Stability of ketone bodies in serum in dependence on storage time and storage temperature. *Clin Lab* 47, 399–403.
- Garber, A.J., P.H. Menzel, G. Boden, and O.E. Owen. (1974) Hepatic ketogenesis and gluconeogenesis in humans. *J Clin Invest* 54, 981–989.
- Georgoudaki, A.-M., K.E. Prokopec, V.F. Boura, E. Hellqvist, S. Sohn, J. Östling, R. Dahan, R.A. Harris, M. Rantalainen, D. Klevebring, M. Sund, S.E. Brage, J. Fuxe, C. Rolny, F. Li, J.V. Ravetch, and M.C.I. Karlsson. (2016) Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis. *Cell Reports* 15, 2000–2011.
- Gore, D.C., D. Chinkes, J. Heggers, D.N. Herndon, S.E. Wolf, and M. Desai. (2001) Association of Hyperglycemia with Increased Mortality after Severe Burn Injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 51, 540.
- Gore, D.C., A. Ferrando, J. Barnett, S.E. Wolf, M. Desai, D.N. Herndon, C. Goodwin, and R.R. Wolfe. (2000) Influence of glucose kinetics on plasma lactate concentration and energy expenditure in severely burned patients. *J Trauma* 49, 673–677; discussion 677-678.
- Goren, I., N. Allmann, N. Yogev, C. Schürmann, A. Linke, M. Holdener, A. Waisman, J. Pfeilschifter, and S. Frank. (2009) A Transgenic Mouse Model of Inducible Macrophage Depletion. *Am J Pathol* 175, 132–147.
- Gurtner, G.C., S. Werner, Y. Barrandon, and M.T. Longaker. (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321.
- Hickman, E., T. Smyth, C. Cobos-Urbe, R. Immormino, M.E. Rebuli, T. Moran, N.E. Alexis, and I. Jaspers. (2023) Expanded characterization of in vitro polarized M0, M1, and M2 human monocyte-derived macrophages: Bioenergetic and secreted mediator profiles. *PLOS ONE* 18, e0279037.
- Hoeksema, M.A., M.J. Gijbels, J. Van den Bossche, S. van der Velden, A. Sijm, A.E. Neele, T. Seijkens, J.L. Stöger, S. Meiler, M.C. Boshuizen, G.M. Dallinga-Thie, J.H. Levels, L. Boon, S.E. Mullican, N.J. Spann, J.P. Cleutjens, C.K. Glass, M.A. Lazar, C.J. de Vries, E.A. Biessen, M.J. Daemen, E. Lutgens, and M.P. de Winther. (2014) Targeting macrophage Histone deacetylase 3 stabilizes atherosclerotic lesions. *EMBO Mol Med* 6, 1124–1132.

- Hu, R., C.-Q. Xia, E. Butfiloski, and M. Clare-Salzler. (2018) Effect of high glucose on cytokine production by human peripheral blood immune cells and type I interferon signaling in monocytes: Implications for the role of hyperglycemia in the diabetes inflammatory process and host defense against infection. *Clinical Immunology* 195, 139–148.
- Huang, S.-M., C.-S. Wu, M.-H. Chiu, C.-H. Wu, Y.-T. Chang, G.-S. Chen, and C.-C.E. Lan. (2019) High glucose environment induces M1 macrophage polarization that impairs keratinocyte migration via TNF- α : An important mechanism to delay the diabetic wound healing. *Journal of Dermatological Science* 96, 159–167.
- Huen, S.C., A. Wang, K. Feola, R. Desrouleaux, H.H. Luan, R. Hogg, C. Zhang, Q.-J. Zhang, Z.-P. Liu, and R. Medzhitov. (2021) Hepatic FGF21 preserves thermoregulation and cardiovascular function during bacterial inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 218, e20202151.
- Ishii, M., H. Wen, C.A.S. Corsa, T. Liu, A.L. Coelho, R.M. Allen, W.F. Carson IV, K.A. Cavassani, X. Li, N.W. Lukacs, C.M. Hogaboam, Y. Dou, and S.L. Kunkel. (2009) Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood* 114, 3244–3254.
- Kaelin, W.G. (2011) Cancer and altered metabolism: potential importance of hypoxia-inducible factor and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76, 335–345.
- Kashfi, K., J. Kannikal, and N. Nath. (2021) Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells* 10, 3194.
- Krzyszczuk, P., R. Schloss, A. Palmer, and F. Berthiaume. (2018) The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol* 9, 419.
- Liu, P.-S., H. Wang, X. Li, T. Chao, T. Teav, S. Christen, G. Di Conza, W.-C. Cheng, C.-H. Chou, M. Vavakova, C. Muret, K. Debackere, M. Mazzone, H.-D. Huang, S.-M. Fendt, J. Ivanisevic, and P.-C. Ho. (2017) α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nature Immunology* 18, 985–994.
- Loenarz, C., and C.J. Schofield. (2008) Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nat Chem Biol* 4, 152–156.
- Louiselle, A.E., S.M. Niemiec, C. Zgheib, and K.W. Liechty. (2021) Macrophage polarization and diabetic wound healing. *Transl Res* 236, 109–116.
- Lucas, T., A. Waisman, R. Ranjan, J. Roes, T. Krieg, W. Müller, A. Roers, and S.A. Eming. (2010) Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 184, 3964–3977.

- Luda, K.M., J. Longo, S.M. Kitchen-Goosen, L.R. Duimstra, E.H. Ma, M.J. Watson, B.M. Oswald, Z. Fu, Z. Madaj, A. Kupai, B.M. Dickson, L.M. DeCamp, M.S. Dahabieh, S.E. Compton, R. Teis, I. Kaymak, K.H. Lau, D.P. Kelly, P. Puchalska, K.S. Williams, C.M. Krawczyk, D. Lévesque, F.-M. Boisvert, R.D. Sheldon, S.B. Rothbart, P.A. Crawford, and R.G. Jones. (2023) Ketolysis drives CD8⁺ T cell effector function through effects on histone acetylation. *Immunity* .
- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23, 549–555.
- Mårtensson, J., L. Björkman, S. Lind, M.B. Viklund, L. Zhang, S. Gutierrez, C. Dahlgren, M. Sundqvist, X. Xie, and H. Forsman. (2023) The ketone body acetoacetate activates human neutrophils through FFAR2. *Journal of Leukocyte Biology* 113, 577–587.
- Martin, P. (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75–81.
- McGarry, J.D., and D.W. Foster. (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49, 395–420.
- McNeil, C.A., C. Pramfalk, S.M. Humphreys, and L. Hodson. (2014) The storage stability and concentration of acetoacetate differs between blood fractions. *Clin Chim Acta* 433, 278–283.
- Medzhitov, R., D.S. Schneider, and M.P. Soares. (2012) Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science* 335, 936–941.
- Minutti, C.M., and J.A. Knipper. (2017) Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 61, 3–11.
- Mirza, R., L.A. DiPietro, and T.J. Koh. (2009) Selective and Specific Macrophage Ablation Is Detrimental to Wound Healing in Mice. *Am J Pathol* 175, 2454–2462.
- Mirza, R.E., M.M. Fang, W.J. Ennis, and T.J. Koh. (2013) Blocking Interleukin-1 β Induces a Healing-Associated Wound Macrophage Phenotype and Improves Healing in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 62, 2579–2587.
- Mosser, D.M., and J.P. Edwards. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969.
- Na, J., K. Lee, W. Na, J.-Y. Shin, M.-J. Lee, T.Y. Yune, H.K. Lee, H.-S. Jung, W.S. Kim, and B.-G. Ju. (2016) Histone H3K27 Demethylase JMJD3 in Cooperation with NF- κ B Regulates Keratinocyte Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology* 136, 847–858.
- Newman, J.C., and E. Verdin. (2014) Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 42–52.

- Noe, J.T., B.E. Rendon, A.E. Geller, L.R. Conroy, S.M. Morrissey, L.E.A. Young, R.C. Bruntz, E.J. Kim, A. Wise-Mitchell, M. Barbosa de Souza Rizzo, E.R. Relich, B.V. Baby, L.A. Johnson, H.C. Affronti, K.M. McMasters, B.F. Clem, M.S. Gentry, J. Yan, K.E. Wellen, R.C. Sun, and R.A. Mitchell. (2021) Lactate supports a metabolic-epigenetic link in macrophage polarization. *Science Advances* 7, eabi8602.
- Novak, M.L., and T.J. Koh. (2013) Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol* 93, 875–881.
- Okabe, Y., and R. Medzhitov. (2016) Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* 17, 9–17.
- O’Neill, L.A.J., and E.J. Pearce. (2016) Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 213, 15–23.
- Owen, O.E., P. Felig, A.P. Morgan, J. Wahren, and G.F. Cahill. (1969) Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48, 574–583.
- Puchalska, P., and P.A. Crawford. (2017) Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. *Cell Metab* 25, 262–284.
- Puchalska, P., X. Huang, S.E. Martin, X. Han, G.J. Patti, and P.A. Crawford. (2018) Isotope Tracing Untargeted Metabolomics Reveals Macrophage Polarization-State-Specific Metabolic Coordination across Intracellular Compartments. *iScience* 9, 298–313.
- Puchalska, P., S.E. Martin, X. Huang, J.E. Lengfeld, B. Daniel, M.J. Graham, X. Han, L. Nagy, G.J. Patti, and P.A. Crawford. (2019) Hepatocyte-Macrophage Acetoacetate Shuttle Protects against Tissue Fibrosis. *Cell Metabolism* 29, 383-398.e7.
- Raziyeva, K., Y. Kim, Z. Zharkinbekov, K. Kassymbek, S. Jimi, and A. Saparov. (2021) Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules* 11, 700.
- Robinson, A.M., and D.H. Williamson. (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiological Reviews* 60, 143–187.
- Saha, S., I.N. Shalova, and S.K. Biswas. (2017) Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. *Immunological Reviews* 280, 102–111.
- Satoh, T., O. Takeuchi, A. Vandenbon, K. Yasuda, Y. Tanaka, Y. Kumagai, T. Miyake, K. Matsushita, T. Okazaki, T. Saitoh, K. Honma, T. Matsuyama, K. Yui, T. Tsujimura, D.M. Standley, K. Nakanishi, K. Nakai, and S. Akira. (2010) The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 11, 936–944.
- Shakespeare, M.R., M.A. Halili, K.M. Irvine, D.P. Fairlie, and M.J. Sweet. (2011) Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends in Immunology* 32, 335–343.

- Sharifiaghdam, M., E. Shaabani, R. Faridi-Majidi, S.C.D. Smedt, K. Braeckmans, and J.C. Fraire. (2022) Macrophages as a therapeutic target to promote diabetic wound healing. *Molecular Therapy* 30, 2891–2908.
- Shimazu, T., M.D. Hirsche, J. Newman, W. He, K. Shirakawa, N. Le Moan, C.A. Grueter, H. Lim, L.R. Saunders, R.D. Stevens, C.B. Newgard, R.V. Farese, R. de Cabo, S. Ulrich, K. Akassoglou, and E. Verdin. (2013) Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339, 211–214.
- Stillman, T.J., P.J. Baker, K.L. Britton, and D.W. Rice. (1993) Conformational Flexibility in Glutamate Dehydrogenase: Role of Water in Substrate Recognition and Catalysis. *Journal of Molecular Biology* 234, 1131–1139.
- Toda, G., T. Yamauchi, T. Kadowaki, and K. Ueki. (2021) Preparation and culture of bone marrow-derived macrophages from mice for functional analysis. *STAR Protocols* 2, 100246.
- Tran, K.A., C.M. Dillingham, and R. Sridharan. (2019) The role of α -ketoglutarate-dependent proteins in pluripotency acquisition and maintenance. *J Biol Chem* 294, 5408–5419.
- Van Dyken, S.J., and R.M. Locksley. (2013) Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol* 31, 317–343.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, research0034.1-research0034.11.
- Wang, A., S.C. Huen, H.H. Luan, S. Yu, C. Zhang, J.-D. Gallezot, C.J. Booth, and R. Medzhitov. (2016) Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation. *Cell* 166, 1512-1525.e12.
- Wang, Q., G. Zhu, X. Cao, J. Dong, F. Song, and Y. Niu. (2017) Blocking AGE-RAGE Signaling Improved Functional Disorders of Macrophages in Diabetic Wound. *Journal of Diabetes Research* 2017, e1428537.
- Weis, E.-M., P. Puchalska, A.B. Nelson, J. Taylor, I. Moll, S.S. Hasan, M. Dewenter, M. Hagenmüller, T. Fleming, G. Poschet, A. Hotz-Wagenblatt, J. Backs, P.A. Crawford, and A. Fischer. (2022) Ketone body oxidation increases cardiac endothelial cell proliferation. *EMBO Molecular Medicine* 14, .
- Wilhelm, C., J. Surendar, and F. Karagiannis. (2021) Enemy or ally? Fasting as an essential regulator of immune responses. *Trends in Immunology* 42, 389–400.

- Wynn, T.A., and L. Barron. (2010) Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis* 30, 245–257.
- Wynn, T.A., and K.M. Vannella. (2016) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44, 450–462.
- Xue, J., S.V. Schmidt, J. Sander, A. Draffehn, W. Krebs, I. Quester, D. De Nardo, T.D. Gohel, M. Emde, L. Schmidleithner, H. Ganesan, A. Nino-Castro, M.R. Mallmann, L. Labzin, H. Theis, M. Kraut, M. Beyer, E. Latz, T.C. Freeman, T. Ulas, and J.L. Schultze. (2014) Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40, 274–288.
- Yoo, K.H., and L. Hennighausen. (2011) EZH2 Methyltransferase and H3K27 Methylation in Breast Cancer. *Int J Biol Sci* 8, 59–65.
- Zhang, H., K. Tang, J. Ma, L. Zhou, J. Liu, L. Zeng, L. Zhu, P. Xu, J. Chen, K. Wei, X. Liang, J. Lv, J. Xie, Y. Liu, Y. Wan, and B. Huang. (2020) Ketogenesis-generated β -hydroxybutyrate is an epigenetic regulator of CD8⁺ T-cell memory development. *Nat Cell Biol* 22, 18–25.
- Zhong, R., R. Miao, J. Meng, R. Wu, Y. Zhang, and D. Zhu. (2021) Acetoacetate promotes muscle cell proliferation via the miR-133b/SRF axis through the Mek-Erk-MEF2 pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 53, 1009–1016.
- Zhu, H., D. Bi, Y. Zhang, C. Kong, J. Du, X. Wu, Q. Wei, and H. Qin. (2022) Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations. *Signal Transduct Target Ther* 7, 11.
- Zou, X., J. Meng, L. Li, W. Han, C. Li, R. Zhong, X. Miao, J. Cai, Y. Zhang, and D. Zhu. (2016) Acetoacetate Accelerates Muscle Regeneration and Ameliorates Muscular Dystrophy in Mice. *J Biol Chem* 291, 2181–2195.

Source of support.

This study was supported by institutional grants from Inserm, the University of Angers and the University Hospital of Angers.

Acknowledgments.

The authors sincerely acknowledge members of the Animal facility and of the Cytometry and qPCR facility of the University of Angers for expert technical assistance. This work was performed in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment for the future program ANR-11-LABX-0016-01 and of the integrated research program 3I-Impact supported by the University of Angers and the University Hospital of Angers.

Conflict of interest.

The authors declare no competing interests.

Correspondence.

Pascale Jeannin, Institut de Biologie en Santé, CHU Angers, 4 rue Larrey, F-49933 Angers
pascale.jeannin@univ-angers.fr; +33 (0) 244 688 300

Supplemental data:

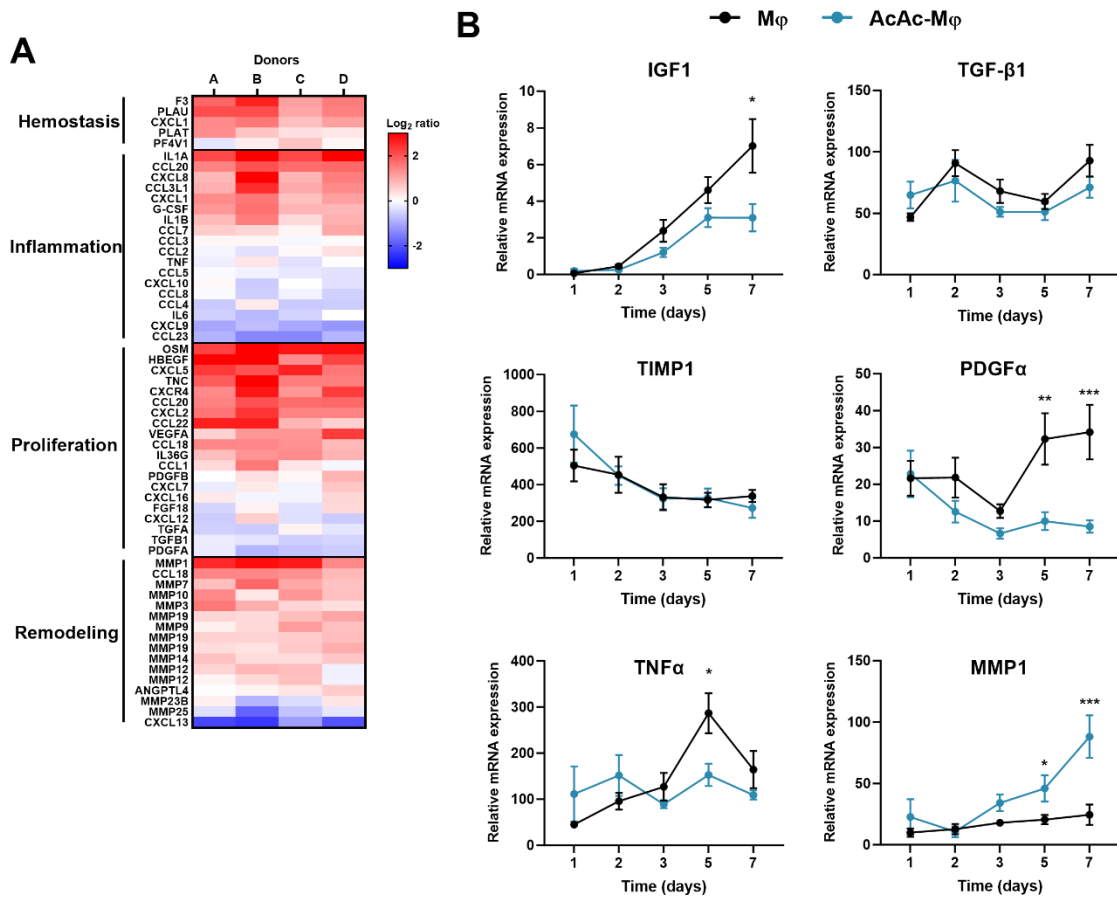


Figure S1. A. The relative expression of the indicated mRNA was assessed by qPCR in day-5 AcAc-Mφ versus Mφ. The normalized values for each mRNA from four different donors are represented as a heat-map using a color scale, where blue and red represent expression above and below the mean, respectively (n=4). **B.** Monocytes were cultured for 7 days with M-CSF in the absence (Mφ) or presence of AcAc (AcAc-Mφ). The relative expression of the mRNA encoding *IGF-1*, *TGF-β1*, *PDGFα*, *TNFα*, *MMP1* and *TIMP1* was assessed by qPCR at 6 h to day 7 after a 6 h stimulation with LPS. Mean ± SEM (n=6); * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Two-way Anova test).

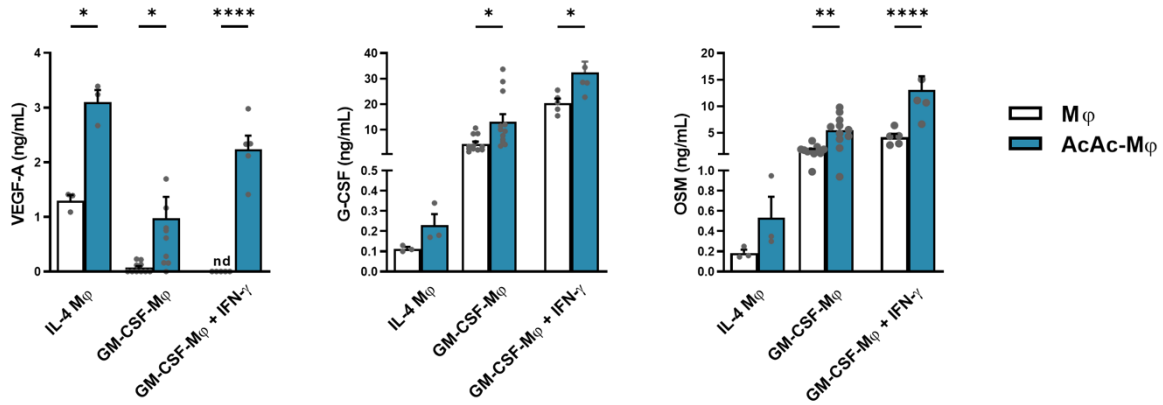


Figure S2. Monocytes were cultured for 5 days with GM-CSF (GM-M ϕ), GM-CSF plus IFN γ (GM-CSF-M ϕ + IFN γ) or M-CSF plus IL-4 (IL-4-M ϕ), in absence or presence of 5 mM AcAc. Day-5 M ϕ were stimulated for 48 h with LPS before quantification of VEGFA, G-CSF and OSM in cell culture supernatants. Mean \pm SEM (n=3-12); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (One-way Anova test).

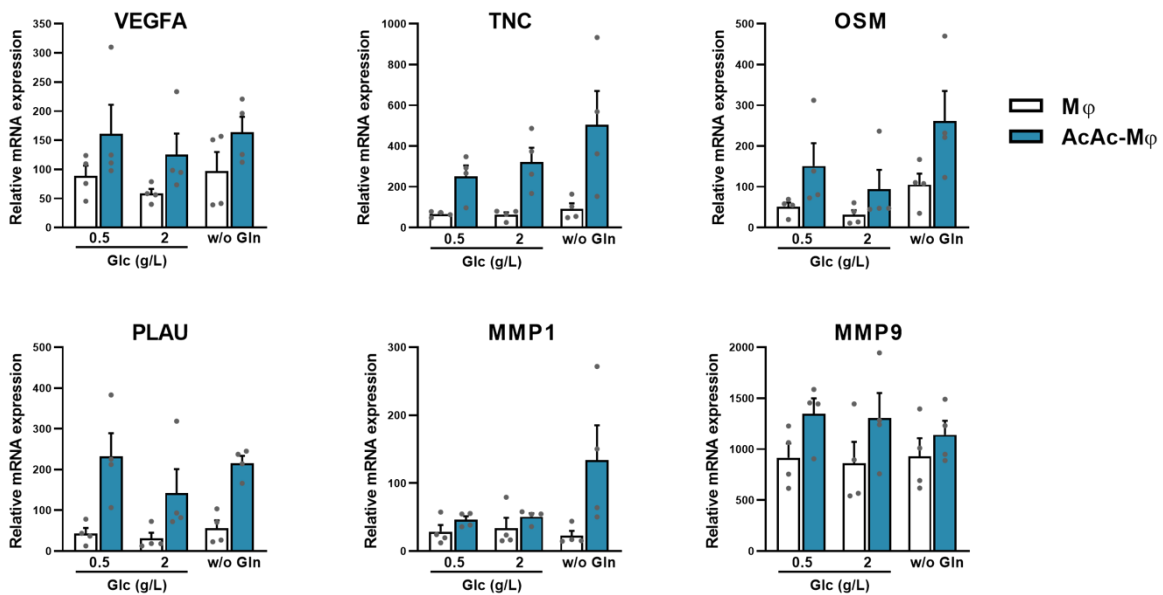


Figure S3. Monocytes were cultured for 3 days in the absence (M ϕ) or presence of AcAc (AcAc-M ϕ) in culture medium containing 0.5 g/L glucose (Glc), 2 g/L Glc or glutamine free (w/o Gln) and were stimulated for 6 h with LPS. The expression of *VEGFA*, *TNC*, *OSM*, *PLAU*, *MMP1* and *MMP9* mRNA was analyzed by RT-qPCR. Mean \pm SEM (n=4).

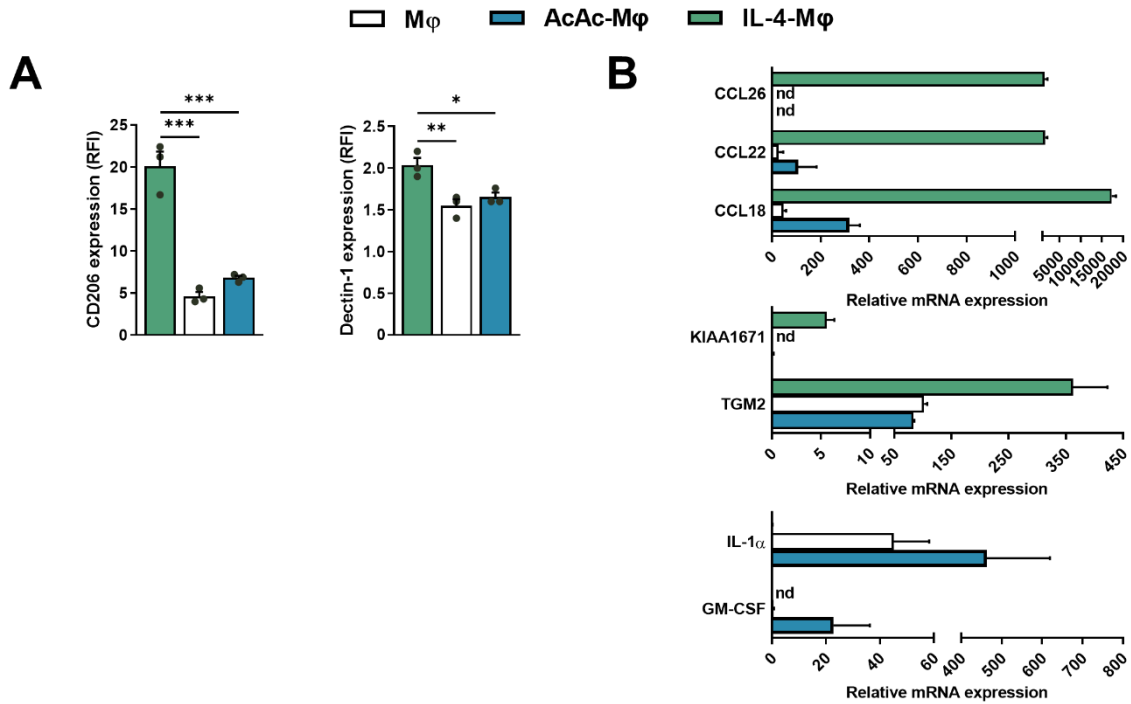


Figure S4. A. The expression of Dectin-1 and CD206 was analyzed by flow cytometry after 48 h of stimulation with LPS on day-5 M ϕ , AcAc-M ϕ and IL-4-M ϕ . **B.** The relative mRNA expression of genes encoding *CCL26*, *CCL22*, *CCL18*, *KIAA1671*, *TGM2*, *IL-1 α* and *CSF2* was analyzed in day-5 M ϕ after 6 h of stimulation with LPS. Mean \pm SEM (n=3); * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (One-way Anova test).

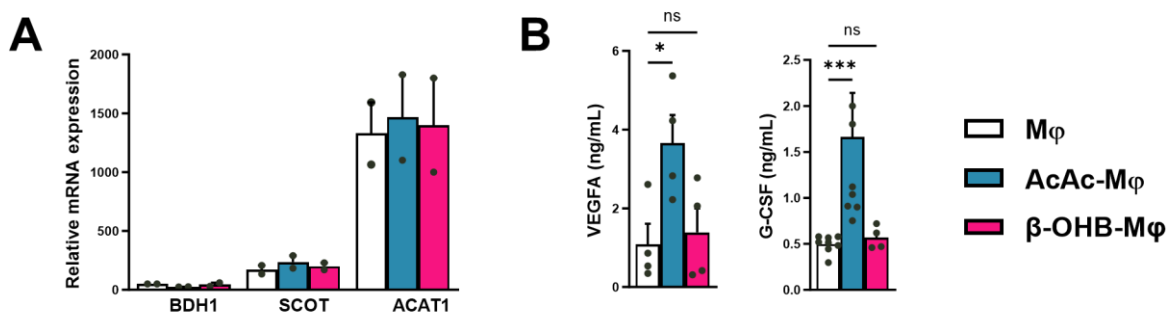


Figure S5. Monocytes were cultured with M-CSF in the absence (M ϕ) or presence of 5 mM β -OHB (β -OHB-M ϕ) or 5 mM AcAc (AcAc-M ϕ). **A.** The relative expression of *BDH1*, *SCOT* and *ACAT1* mRNA was analyzed at day 5 (n=2). **B.** G-CSF and VEGFA were quantified in day-5 M ϕ after stimulation with LPS. **A,B.** Mean \pm SEM (n=4-7); * p<0.05 (One-way Anova test).

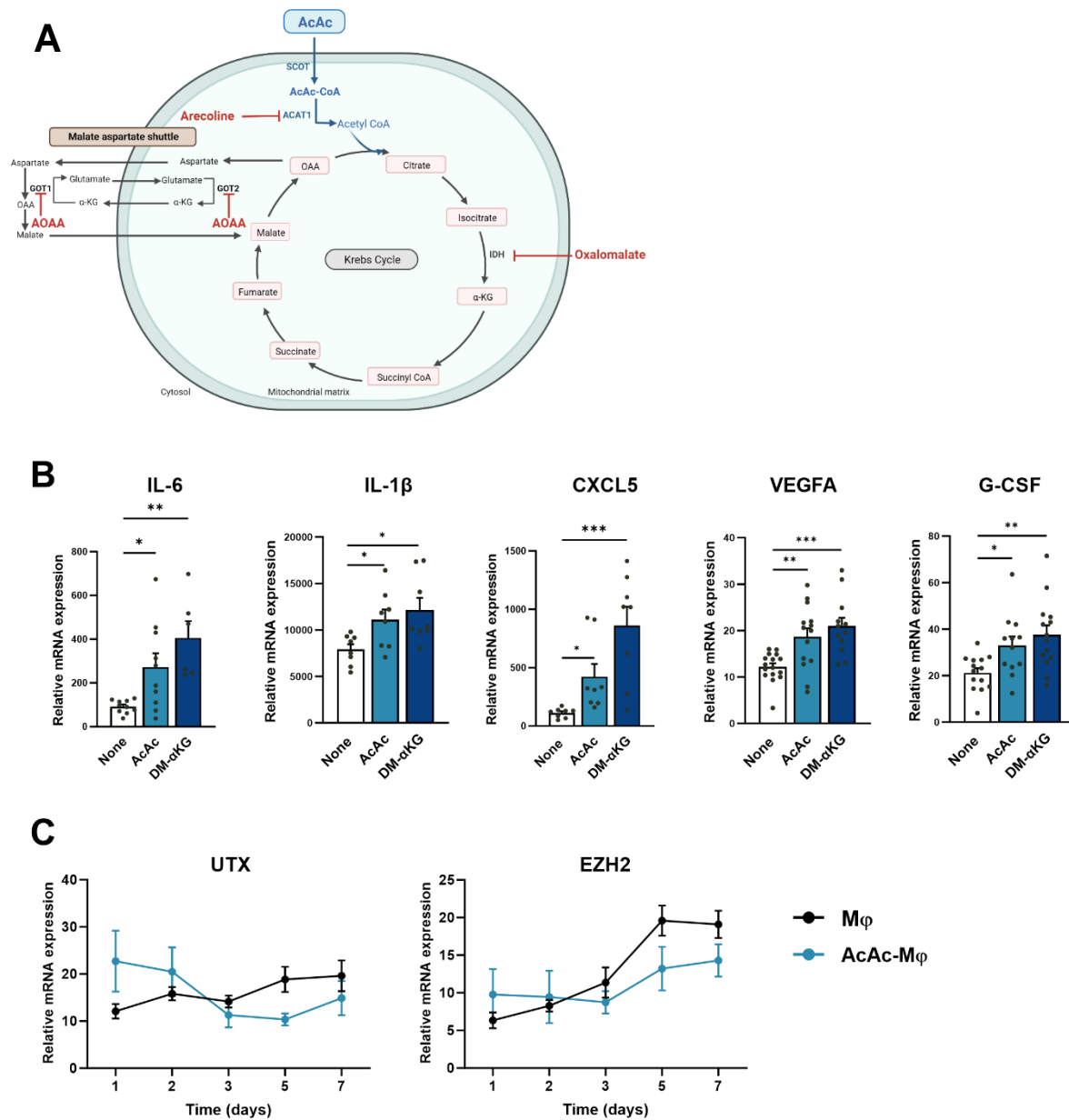


Figure S6. **A.** Schematic representation of the metabolism of AcAc into Acetyl-CoA via SCOT and ACAT1 and the AcAc metabolism into α -KG. Inhibitors are in red. **B.** Monocytes were cultured with M-CSF in the absence or presence of 5 mM AcAc or DM- α KG. *IL-6*, *IL-1 β* , *CXCL5*, *VEGFA* and *G-CSF* mRNA was assessed by RT-qPCR and results are expressed as a relative mRNA level compared to the expression of the housekeeping gene RPS18 (n=8-15). **C.** Monocytes were cultured with M-CSF in the absence or presence of 5 mM AcAc. M ϕ were then stimulated with LPS for 6 h and the expression *EZH2* and *UTX* were assessed by RT-qPCR at the indicated times. Results are expressed as a relative level of mRNA expression (n=6). **B,C.** Mean \pm SEM, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (One-way Anova test).

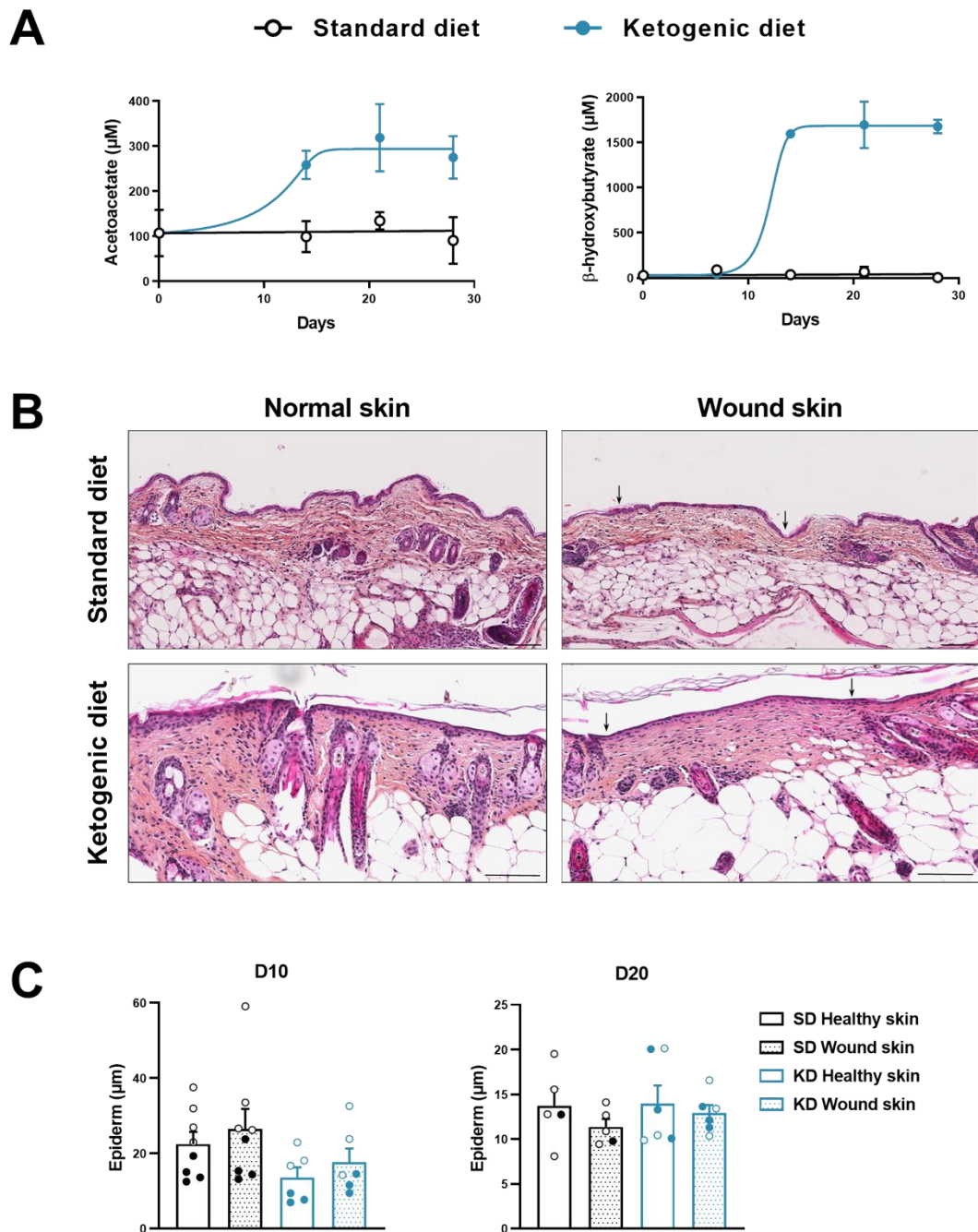


Figure S7. A. Monitoring of serum AcAc (left panel) and β -HOB (right panel) levels in mice fed ketogenic or standard diet ($n=3$). **B.** Histological sections of dorsal skin biopsies taken from normal skin (left panel) and 20 days after injury (right panel) were stained with hematoxylin/eosin (H&E). Black arrows demark the wound edge. Scale bar=100 μm . **C.** Epithelium thickness was measured at day 10 post-injury. Males represented with filled dots and females with empty dots ($n=5-8$).

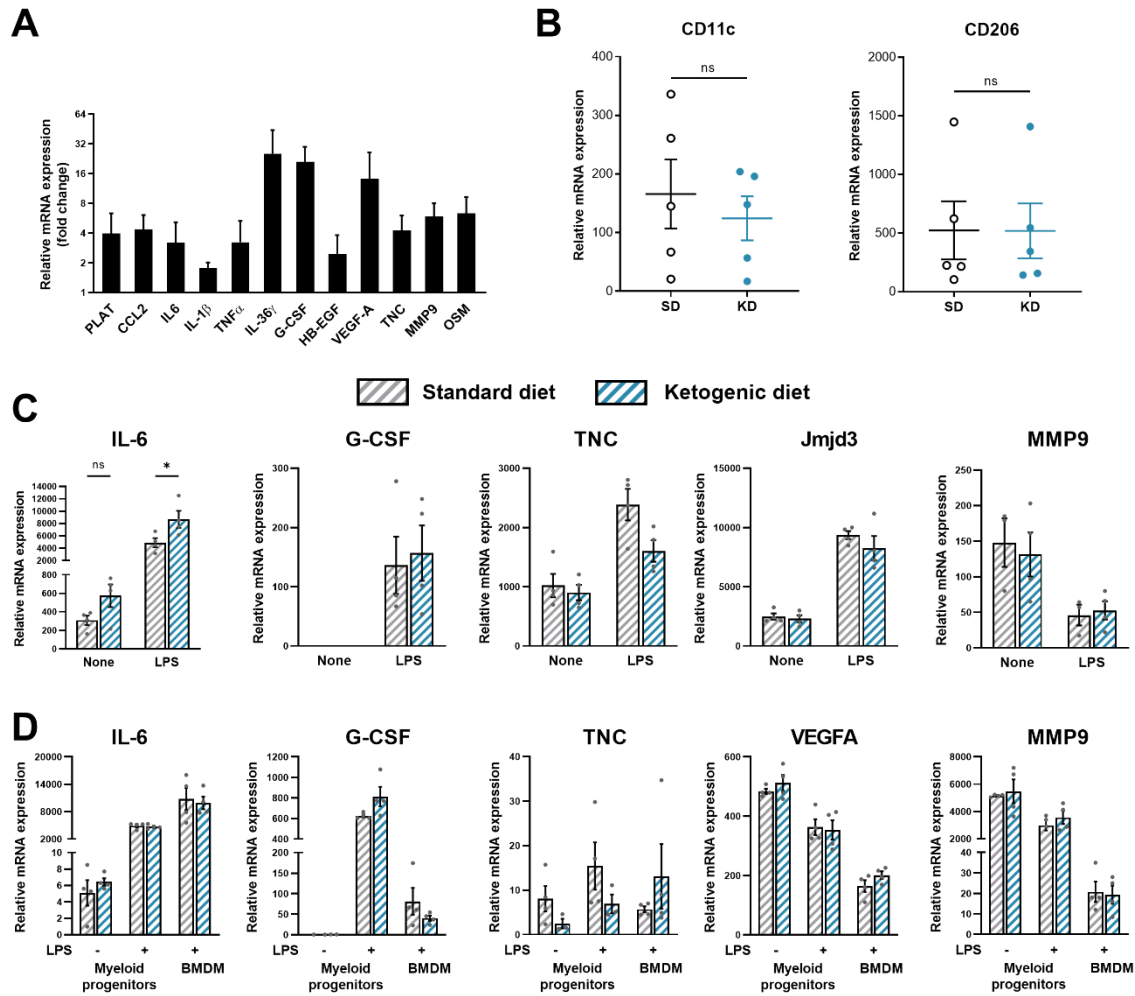


Figure S8. A. Bone marrow cells (BMDM) were cultured for 6 days with M-CSF without or with 5 mM AcAc. The relative expression of the mRNA encoding *PLAT*, *TNF α* , *IL-1 β* , *CCL2*, *IL-6*, *TNC*, *HB-EGF*, *OSM*, *IL-36 γ* , *MMP9*, *VEGFA* and *G-CSF* was assessed by RT-qPCR after a 6 h stimulation with LPS (n=3). **B-D.** Mice were fed with SD or KD. **B.** The relative expression of the mRNA encoding *CD11c* and *CD206* was assessed by RT-qPCR in skin M ϕ isolated from non-treated mice (n=5). **C.** Resident spleen macrophages were isolated and either stimulated or not with LPS. The relative expression of mRNA encoding *IL-6*, *G-CSF*, *TNC*, *Jmjd3* and *MMP9* was assessed by RT-qPCR. **D.** Myeloid progenitors and BMDM were isolated and either stimulated or not with LPS. The relative expression of mRNA encoding *IL-6*, *G-CSF*, *TNC*, *VEGFA* and *MMP9* was assessed by RT-qPCR. SD, standard diet; KD, ketogenic diet. **B-D.** Mean \pm SEM (n=4-5); * p<0.05 (Welch t-test and Two-way Anova test).

Discussion et perspectives

Les corps cétoniques constituent une source d'énergie alternative pour tous les tissus extra-hépatiques pendant les périodes où la disponibilité en glucides diminue, comme lors d'un jeûne prolongé ou d'un régime cétogène. Le régime cétogène a reçu beaucoup d'attention ces dernières années en raison de son rôle bénéfique dans de nombreuses pathologies (cancer, diabète de type 2, maladies neurodégénératives et cardiaques) (Zhu et al., 2022). Cependant, le potentiel effet des corps cétoniques sur la cicatrisation des plaies n'a pas encore été étudié. Nous démontrons ici que les macrophages générés en présence du corps cétonique AcAc présentent un profil réparateur avec une expression séquentielle, au cours du temps, des médiateurs impliqués dans chacune des phases du processus de cicatrisation. Il est intéressant de noter que cette expression séquentielle est associée à des modifications des niveaux de méthylation de H3K27 sur les promoteurs des gènes cibles. De plus, nous montrons qu'un régime cétogène accélère la vitesse de cicatrisation des plaies *in vivo* et que ce processus s'accompagne de la présence de macrophages présentant un profil réparateur. Ces résultats identifient donc l'AcAc comme un médiateur unique qui favorise la génération de macrophages réparateurs ainsi que la réparation tissulaire.

Discussion

A. Un signal unique qui confère aux macrophages l'acquisition de marqueurs inflammatoires puis réparateurs

Nous montrons, pour la première fois à notre connaissance, que la métabolisation d'un nutriment, l'AcAc, favorise la génération de cellules avec un phénotype réparateur et, de manière tout à fait surprenante, que l'acquisition des marqueurs M1 puis M2 s'effectue de manière chronologique.

L'AcAc est un corps cétonique, comme le β -OHB. Comme décrit dans de récentes études, les monocytes et les macrophages n'expriment que faiblement l'enzyme BDH1 (qui permet l'oxydation du β -OHB en AcAc), expliquant pourquoi il ne module pas ou peu le phénotype des macrophages (Puchalska et al., 2019; Adam et al., 2021).

Il a déjà été rapporté dans la littérature que des métabolites modulent la polarisation des macrophages. Le glucose et les lipides oxydés induisent la différenciation des monocytes en macrophages inflammatoires (Freemerman et al., 2014; Yan and Horng, 2020). Au contraire, d'autres

substrat, tels que l'itaconate (O'Neill and Artyomov, 2019) et la glutamine (Liu et al., 2017) confèrent un phénotype régulateur voire même réparateur dans le cas de l'itaconate (Maassen et al., 2022).

Il serait donc intéressant d'évaluer si ces deux métabolites confèrent un phénotype similaire à celui des AcAc-M ϕ et, dans l'affirmative, de comparer leur potentiel « réparateur » *in vivo* comparativement aux corps cétoniques. Si les mécanismes mis en jeu sont différents, une combinaison corps cétoniques plus un de ces deux substrats pourrait être évaluée afin d'évaluer un effet additif ou de potentialisation sur la réparation tissulaire.

Les macrophages jouent un rôle clé dans le processus de réparation tissulaire (Minutti and Knipper, 2017). De manière surprenante, nous avons observé une acquisition séquentielle par les AcAc-M ϕ , des gènes impliqués dans les trois étapes du processus de cicatrisation. Les AcAc-M ϕ présentent un profil inflammatoire à des temps précoces (IL-1 β , IL-6) puis acquièrent un profil réparateur avec l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire à des temps plus tardifs (VEGFA, OSM, TNC, PLAU, MMP1, MMP9). Au début du processus de cicatrisation, les macrophages présentent majoritairement un profil inflammatoire M1 puis un profil M2 lors de la phase de prolifération cellulaire et de remodelage. Les facteurs locaux impliqués dans cette polarisation successive restent mal connus. Des signaux inflammatoires endogènes ou exogènes (exprimés par des cellules mortes et/ou des microorganismes, respectivement) pourraient favoriser la polarisation en M1 alors que des médiateurs tels que les cytokines IL-10, IL-4 et IL-13 et l'élimination des cellules mortes favorisent la polarisation en M2 (Mosser and Edwards, 2008).

Bien que l'IL-4 ait été décrite comme un médiateur induisant la génération *in vitro* des macrophages réparateurs prototypes, son implication dans le processus de réparation tissulaire reste controversée. Nos résultats montrent que le profil des AcAc-M ϕ diffère de celui des macrophages générés en présence d'IL-4. Les AcAc-M ϕ expriment plus faiblement les marqueurs membranaires CD206 et dectin-1 ainsi que les transcrits CCL18, CCL22, CCL26, KIAA1671 et TGM2 que les IL-4-M ϕ . Soutenant ces observations, des études ont montré que l'IL-4 n'est pas nécessaire pour la cicatrisation *in vivo* (Pinhal-Enfield et al., 2003; Daley et al., 2010). Daley et al ont ainsi montré que la cicatrisation des plaies et le phénotype de réparateur des macrophages ne sont pas affectés chez les souris déficientes pour le récepteur à l'IL-4.

Une question subsiste quant à l'origine des sous-types de macrophages M1 et M2 au niveau de la lésion tissulaire. A ce jour, il n'est pas établi si ces deux populations proviennent de la différenciation des monocytes recrutés à différents temps du processus de cicatrisation (M1 aux temps précoces, M2 aux temps tardifs), ou, comme cela est généralement décrit, que ces populations dérivent d'un switch

phénotypique de M1 vers M2. Il convient de souligner qu'une transition des macrophages de type M1 en M2 n'a jamais été mise en évidence, alors que différentes stratégies de reprogrammation des macrophages M2 en macrophages M1 ont été identifiées (Georgoudaki et al., 2016; Kashfi et al., 2021). Il est important de souligner également que ces deux processus ne sont pas exclusifs et peuvent agir de concert.

Nous montrons donc ici que les AcAc-M ϕ présentent un phénotype de réparation tissulaire distinct des macrophages prototypes réparateurs (IL-4-M ϕ) et qu'ils expriment séquentiellement des marqueurs de l'inflammation puis de la prolifération et du remodelage tissulaire, suggérant que la métabolisation de l'AcAc entraîne une régulation épigénétique.

B. Effet de la métabolisation de l'AcAc sur le profil épigénétique des macrophages

Ces dernières années, l'épigénétique est apparue comme un régulateur clé de la polarisation des macrophages. Les marques épigénétiques dynamiques s'adaptent aux signaux présents dans l'environnement. Des études récentes ont mis en évidence des interactions entre métabolisme et épigénétique dans la polarisation des macrophages (Baardman et al., 2015; Noe et al., 2021). Dans cette étude, nous montrons que la métabolisation de l'AcAc par les macrophages induit des modifications épigénétiques via l'activation de l'histone H3K27 déméthylase Jmjd3. L'AcAc est un métabolite qui sert de carburant alternatif pour les mitochondries des cellules extra-hépatiques, stimulant la respiration et la biogenèse mitochondriale en alimentant le cycle de Krebs (de plusieurs types cellulaires) (Frey et al., 2017; Denoon et al., 2020; Adam et al., 2021). Nous suggérons ici une nouvelle voie impliquée dans la métabolisation de l'AcAc : la voie de la navette malate aspartate qui est impliquée dans la synthèse d' α -KG (Bölsterli et al., 2022). Cette navette permet au NADH d'être transféré à travers la membrane mitochondriale interne sous la forme d'un métabolite réduit, le malate. Le malate est importé du cytosol dans la matrice mitochondriale en même temps que l'exportation de α -KG de la matrice mitochondriale vers le cytosol. De plus, nous avons observé que le rapport α -KG/succinate, qui favorise l'activation de Jmjd3, est augmenté chez les AcAc-M ϕ .

Nous démontrons que l'acquisition du phénotype des AcAc-M ϕ dépend de l'activation de Jmjd3 et de la déméthylation de l'histone H3K27. À l'appui de cette observation, dans les kératinocytes épidermiques humains lésés, Jmjd3 est activée et déclenche, de manière similaire aux AcAc-M ϕ , l'expression de gènes inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α), de métalloprotéases et de facteurs de croissance (HB-EGF, HGF) (Na et al., 2016). En accord avec nos données, l'inhibition de Jmjd3 par

l'inhibiteur GSK-J4 réduit l'expression de ces gènes dans les kératinocytes et retarde la fermeture de la plaie.

L'activation de Jmjd3, dans les cellules myéloïdes humaines ou murines, favorise également la polarisation en macrophages de types M2 au travers de la déméthylation de H3K27me3 au niveau des promoteurs des gènes marqueurs M2 (tel que IRF4) (Ishii et al., 2009; Satoh et al., 2010), notamment via l' α -KG produit via la glutaminolyse (Liu et al., 2017) et augmente l'expression des gènes inflammatoires (IL-1 β , TNF α) dans les macrophages au niveau de la lésion cutanée (Davis et al., 2020; Audu et al., 2022).

Outre la méthylation des histones, l'acétylation est également impliquée dans la polarisation des macrophages (Shakespeare et al., 2011; Hoeksema et al., 2014). Une étude a montré que la polarisation des macrophages avec l'IL-4 augmente les taux d'acétyl-CoA via l'enzyme ACLY (ATP citrate lyase) et que son inhibition induit une diminution d'expression des gènes M2 (Covarrubias et al., 2016). Nous avons observé qu'un inhibiteur de l'enzyme ACLY diminue l'expression des gènes pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et CXCL5) dans les AcAc-M ϕ . Ces données suggèrent que l'AcAc induit probablement des modifications des taux d'acétylation des histones. Cette hypothèse est en accord avec le rôle inhibiteur des histones désacétylases de type I (HDAC) du β -OHB (Shimazu et al., 2013) et de sa capacité à favoriser l'acétylation des histones dans les cellules T CD8+ (Luda et al., 2023). De plus, Shimazu et al ont observé que l'AcAc peut également inhiber les HDAC mais à des concentrations nettement plus importantes que β -OHB.

De nombreuses cellules métabolisent l'AcAc, telles que les cellules musculaires (Zou et al., 2016; Zhong et al., 2021), les neutrophiles (Mårtensson et al., 2023) et les cellules épithéliales rénales (Denoon et al., 2020)]. Il est tentant de spéculer que la métabolisation de l'AcAc par d'autres cellules impliquées dans le processus de réparation des tissus, telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les kératinocytes, favorise leur potentiel réparateur. À l'appui de cette hypothèse, il a été montré que l'activation de Jmjd3 dans les kératinocytes humains leur confère un profil similaire à celui des AcAc-M ϕ (Na et al., 2016).

C. Réponse comportementale

Les corps cétoniques sont synthétisés par le foie en cas de jeûne. Plusieurs études suggèrent que l'anorexie et le jeûne induits lors d'une infection aiguë pourraient être des réponses physiologiques conservées au cours de l'évolution afin d'augmenter la tolérance des tissus (Medzhitov et al., 2012;

Wilhelm et al., 2021). Il a été observé que le métabolisme associé au jeûne augmente la résistance des tissus au stress oxydatif pendant une inflammation bactérienne (Wang et al., 2016) et que le facteur de croissance FGF21, dont l'expression est induite par l'AcAc, régule la thermogénèse et favorise la survie en cas d'inflammation induite par une infection bactérienne (Huen et al., 2021). Renforçant ce rôle bénéfique des corps cétoniques dans la tolérance tissulaire au stress, nous avons précédemment observé que la métabolisation d'AcAc favorise la résistance des cellules à l'acidose en restaurant leur métabolisme et leurs fonctions mitochondriales (Adam et al., 2021). Nos données décrivent un nouveau mécanisme par lequel la résistance des tissus aux stress induite par les corps cétoniques pourrait passer.

La capacité de l'AcAc à faciliter la réparation tissulaire d'une blessure mineure, n'entraînant pas d'anorexie ou de jeûne, et donc sans induire la cétogénèse, nous amène à supposer une possible synthèse locale de corps cétoniques. Bien qu'à ce jour la synthèse de corps cétoniques par des cellules autres que les hépatocytes n'ait été démontrée, l'expression de l'enzyme HMGCS2 par des cellules extra hépatiques, telles que les cellules endothéliales, les entérocytes du côlon, les cardiomyocytes et même les cellules mémoires T CD8+, suggère l'existence d'une cétogénèse extra hépatique (Zhang et al., 2020a; Cheng et al., 2022; Weis et al., 2022).

D. Potentiel thérapeutique des corps cétoniques et/ou de la diète cétogène dans la réparation tissulaire

Dans des situations pathologiques caractérisées par une réparation tissulaire anormale/dérégulée, l'application d'AcAc pourrait contribuer à améliorer le processus de cicatrisation, notamment dans des situations où est observée une polarisation inadaptée des macrophages, comme dans le cas des plaies diabétiques, de la fibrose ou des brûlures graves (Raziyeva et al., 2021).

Dans la cicatrisation des plaies diabétiques, les macrophages jouent un rôle central et des thérapies favorisant la génération de macrophages M2 sont recherchées pour accélérer la cicatrisation (Mirza et al., 2013; Wang et al., 2017; Sharifiaghdam et al., 2022). En effet, tout au long de la cicatrisation diabétique, les macrophages conservent un phénotype pro-inflammatoire du fait d'une inflammation chronique induite notamment par l'hyperglycémie qui prévient la génération de macrophages M2 (Huang et al., 2019; Louiselle et al., 2021).

Les brûlures sont associées avec une réponse hypermétabolique avec augmentation de la concentration du lactate (Gore et al., 2000, 2001) et de glucose induisant un risque accru d'infections et de sepsis. Les macrophages activés peuvent induire une inflammation excessive avec pour conséquence un ralentissement de la cicatrisation et une augmentation de la formation de cicatrices.

Dans ces deux situations, l'AcAc, en modulant l'activité du cycle de Krebs, devrait réduire la glycolyse, mais aussi permettre aux macrophages de passer d'un phénotype inflammatoire à un phénotype réparateur, favorisant ainsi une cicatrisation normale.

Finalement, les macrophages participent activement à la fibrose, en produisant à la fois des médiateurs pro et anti-fibrosants (Wynn and Barron, 2010). Nous avons observé une diminution de l'expression des gènes pro-fibrosant dans les AcAc-Mφ. En accord avec nos observations, Puchalska et al. ont montré que le métabolisme de l'AcAc par les macrophages diminue la fibrose hépatique (Puchalska et al., 2019). Ainsi, la métabolisation de l'AcAc pourrait également être utilisée pour réduire un processus de fibrose.

E. Conclusion

Nos données identifient l'AcAc comme un métabolite central dans la génération de macrophages présentant un phénotype réparateur. Cette molécule naturelle et non toxique possède donc un réel potentiel thérapeutique dans les pathologies associées à des dommages tissulaires importants.

Perspectives

A partir des observations faites sur le profil phénotypique, métabolique et épigénétique des macrophages générés en présence d'AcAc, plusieurs perspectives peuvent être envisagées dans la suite de cette étude.

Tout d'abord, afin de valider le phénotype réparateur des macrophages induit par l'AcAc dans le processus de réparation tissulaire, nous pouvons envisager de mettre en place un modèle de souris dont les macrophages sont déficients en SCOT, enzyme clé dans la métabolisation de l'AcAc. A l'appui de cette hypothèse, une étude a montré que les souris dont les macrophages hépatiques sont déficients en SCOT sont prédisposées à une fibrose hépatique, confortant le rôle de l'AcAc dans la

biologie des macrophages et l'homéostasie tissulaire (Puchalska et al., 2019). Pour cela, je mettrai en place un modèle de souris déficientes par croisement de souris SCOT^{flox/flox} avec des souris LysM^{Cre}.

De plus, nous pouvons également nous demander si l'effet de l'AcAc est transposable aux autres types cellulaires impliqués dans le processus de réparation tissulaire. Pour cela, je m'intéresserai à trois principaux types cellulaires : les cellules endothéliales, les kératinocytes et les fibroblastes pour leurs rôles, respectivement, dans la néovascularisation, la re-épithélialisation et le remodelage tissulaire. Pour chacun de ces types cellulaires, j'analyserai l'impact de l'AcAc sur leur transcriptome et leurs fonctions :

- pour les cellules endothéliales, j'évaluerai l'angiogenèse en mesurant leur capacité à former des capillaires par culture en matrigel et leur migration cellulaire,
- pour les kératinocytes, j'utiliserai des tests de reconstitution de peau en 3D et j'effectuerai des tests de migration cellulaire par blessure (scratch assay),
- pour les fibroblastes, j'analyserai leur capacité à produire une matrice et à se différencier en myofibroblastes.

Ces analyses *in vitro* pourront être complétées par une analyse *in vivo*, en évaluant le transcriptome et le phénotype de ces différents types cellulaires dans des souris nourries sous diète cétogène et ayant subi ou non une lésion cutanée. Ces expériences *in vitro* pourraient être complétées par des expériences de coculture pour préciser le dialogue établi entre ces différents types cellulaires.

Différentes données expérimentales suggèrent que la cétogenèse, longtemps limitée aux hépatocytes, pourrait également avoir lieu localement, dans les tissus. L'expression du transcrit codant pour HMGCS2, enzyme clé du processus de cétogenèse qui permet la condensation de l'acétoacétyl-CoA avec l'acétyl-CoA pour produire HMG-CoA, a été mise en évidence dans les astrocytes, les cellules endothéliales, les entérocytes et les cellules T CD8+ mémoires. Nous avons également observé une expression de HMGCS2 dans la peau de souris. L'ensemble de ces données suggère que la cétogenèse pourrait avoir lieu dans des tissus extra-hépatiques, notamment en cas de stress tissulaire, et qui pourrait contribuer au processus de réparation tissulaire. Nous évaluerons donc une potentielle expression de HMGCS2 dans les cellules de la peau par une approche de transcriptomique spatiale qui nous informera sur l'organisation moléculaire et cellulaire des tissus.

Concernant le processus de réparation tissulaire, mes travaux de recherche ont porté sur un modèle de cicatrisation cutanée consécutive à une blessure mécanique. Il serait intéressant d'explorer le

potentiel de l'AcAc ou du régime cétogène dans des contextes pathologiques cutanés comme les plaies chroniques (diabète) ou aiguës (brûlure).

Dans un premier temps, j'évaluerai l'impact d'un régime cétogène sur la cicatrisation de plaies cutanées dans un modèle de diabète de type 2 induit (souris obèses db/db) (Stachura et al., 2022) et de brûlure thermique, suivant la même démarche expérimentale que durant ma thèse. Si j'obtiens les résultats attendus, j'analyserai, dans un deuxième temps, si cette protection est également associée à une reprogrammation des macrophages au niveau des lésions.

Les données obtenues au cours de ma thèse suggèrent un potentiel intérêt thérapeutique des corps cétoniques dans le processus de réparation tissulaire. Dans ce cadre, il apparaît essentiel de proposer une formulation qui permette d'éviter le phénomène d'adaptation observé chez les animaux nourris sous régime cétogène. Deux stratégies peuvent être envisagées :

Une administration de corps cétoniques par voie orale (qui augmente leur demi-vie) par des boissons riches en cétones ou par gavage à l'AcAc

- Une application locale sous forme de pansement ou hydrogel contenant de l'AcAc
- Une administration de corps cétoniques par voie orale (qui augmente leur demi-vie) par des boissons riches en cétones ou par gavage d'AcAc,
- Une application locale sous forme de pansement ou hydrogel contenant de l'AcAc.

Enfin, nous pourrions envisager, à plus long terme, une analyse épigénétique complète des AcAc-M ϕ . En effet, nos données montrent une régulation des niveaux de méthylation des histones dans les AcAc-M ϕ humains. De plus, des études récentes ont montré que l'AcAc peut également induire une acétylation des histones. D'un point de vue mécanistique, il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de l'AcAc sur les niveaux d'acétylation et de méthylation de l'histone H3 sur la reprogrammation transcriptomique des macrophages en combinant des approches de type ATACseq, ChIPseq et RNAseq. L'implication de ces deux types de modifications dans la signature transcriptomique des AcAc-M ϕ sera évaluée en évaluant les conséquences d'une inhibition d'expression (siRNA) ou de fonction (drogues inhibitrices) des gènes/enzymes impliquées dans l'acétylation et la méthylation des histones.

Mes résultats montrant une régulation épigénétique induite par l'AcAc suggèrent que ce métabolite pourrait également réguler l'immunité entraînée ou « trained immunity ». En effet, l'immunité entraînée est un processus de mémoire immunitaire par lequel les cellules de l'immunité innée, et en particulier les macrophages, présentent une réponse plus rapide et plus intense lors d'un second contact avec le même stimulus (Netea et al., 2011).

L'objectif sera d'évaluer si l'AcAc peut induire une mémoire immunitaire induisant soit une amplification de la réponse immunitaire suite à un second stimulus, soit une tolérance immunitaire. Pour répondre à cette question, j'utiliserai des modèles *in vitro* déjà décrits dans la littérature permettant d'évaluer une amplification (modèle β -glucane) ou une tolérance (modèle LPS) et j'évaluerai l'impact de l'AcAc sur le phénotype des macrophages. L'immunité entraînée fait intervenir une reprogrammation épigénétique avec notamment une régulation des niveaux de méthylation et d'acétylation de l'histone H3 telle que H3K4me1, H3K4me3 et H3K27ac (Divangahi et al., 2021; Fanucchi et al., 2021). Si l'AcAc module l'immunité entraînée, et au vu des modifications épigénétiques induites par l'AcAc que nous avons observées, il serait pertinent par la suite d'analyser le profil épigénétique des AcAc-M ϕ dans ce contexte.

Références bibliographiques

- Abdul Zani, I., S.L. Stephen, N.A. Mughal, D. Russell, S. Homer-Vanniasinkam, S.B. Wheatcroft, and S. Ponnambalam. (2015) Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells* 4, 178–201.
- Adam, C., L. Paolini, N. Gueguen, G. Mabileau, L. Preisser, S. Blanchard, P. Pignon, F. Manero, M. Le Mao, A. Morel, P. Reynier, C. Beauvillain, Y. Delneste, V. Procaccio, and P. Jeannin. (2021) Acetoacetate protects macrophages from lactic acidosis-induced mitochondrial dysfunction by metabolic reprogramming. *Nat Commun* 12, 7115.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Allen, B.G., S.K. Bhatia, J.M. Buatti, K.E. Brandt, K.E. Lindholm, A.M. Button, L.I. Szveda, B.J. Smith, D.R. Spitz, and M.A. Fath. (2013) Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemotherapy responses in lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 19, 3905–3913.
- Anfray, C., A. Ummerino, F.T. Andón, and P. Allavena. (2019) Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses. *Cells* 9, E46.
- Arts, R.J.W., S.J.C.F.M. Moorlag, B. Novakovic, Y. Li, S.-Y. Wang, M. Oosting, V. Kumar, R.J. Xavier, C. Wijmenga, L.A.B. Joosten, C.B.E.M. Reusken, C.S. Benn, P. Aaby, M.P. Koopmans, H.G. Stunnenberg, R. van Crevel, and M.G. Netea. (2018) BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host & Microbe* 23, 89-100.e5.
- Audu, C.O., W.J. Melvin, A.D. Joshi, S.J. Wolf, J.Y. Moon, F.M. Davis, E.C. Barrett, K.D. Mangum, H. Deng, X. Xing, R. Wasikowski, L.C. Tsoi, S.B. Sharma, T.M. Bauer, J. Shadiow, M.A. Corriere, A.T. Obi, S.L. Kunkel, B. Levi, B.B. Moore, J.E. Gudjonsson, A.M. Smith, and K.A. Gallagher. (2022) Macrophage-specific inhibition of the histone demethylase JMJD3 decreases STING and pathologic inflammation in diabetic wound repair. *Cell Mol Immunol* 19, 1251–1262.
- Baardman, J., I. Licht, M.P.J. de Winther, and J. Van den Bossche. (2015) Metabolic-epigenetic crosstalk in macrophage activation. *Epigenomics* 7, 1155–1164.
- Bae, H.R., D.H. Kim, M.H. Park, B. Lee, M.J. Kim, E.K. Lee, K.W. Chung, S.M. Kim, D.S. Im, and H.Y. Chung. (2016) β -Hydroxybutyrate suppresses inflammasome formation by ameliorating endoplasmic reticulum stress via AMPK activation. *Oncotarget* 7, 66444–66454.
- Balasse, E.O., and F. Féry. (1989) Ketone body production and disposal: effects of fasting, diabetes, and exercise. *Diabetes Metab Rev* 5, 247–270.
- Barrea, L., L. Verde, P. Santangeli, S. Lucà, A. Docimo, S. Savastano, A. Colao, and G. Muscogiuri. (2023) Very low-calorie ketogenic diet (VLCKD): an antihypertensive nutritional approach. *J Transl Med* 21, 128.

- Bauer, M., S. Weis, M.G. Netea, and R. Wetzker. (2018) Remembering Pathogen Dose: Long-Term Adaptation in Innate Immunity. *Trends in Immunology* 39, 438–445.
- Bell, E. (2004) Neutrophil NETWORKS. *Nat Rev Immunol* 4, 244–244.
- Benyó, Z., A. Gille, J. Kero, M. Csiky, M.C. Suchánková, R.M. Nüsing, A. Moers, K. Pfeffer, and S. Offermanns. (2005) GPR109A (PUMA-G/HM74A) mediates nicotinic acid-induced flushing. *J Clin Invest* 115, 3634–3640.
- Biswas, S.K., and A. Mantovani. (2012) Orchestration of Metabolism by Macrophages. *Cell Metabolism* 15, 432–437.
- Błyszczuk, P., and Z. Szekanecz. (2020) Pathogenesis of ischaemic and non-ischaemic heart diseases in rheumatoid arthritis. *RMD Open* 6, e001032.
- Boada-Romero, E., J. Martinez, B.L. Heckmann, and D.R. Green. (2020) Mechanisms and physiology of the clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 398–414.
- Bobryshev, Y.V., E.A. Ivanova, D.A. Chistiakov, N.G. Nikiforov, and A.N. Orekhov. (2016) Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res Int* 2016, 9582430.
- Bock, H., and S. Fleischer. (1975) Preparation of a homogeneous soluble D-beta-hydroxybutyrate apodehydrogenase from mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 250, 5774–5781.
- Bolla, A.M., A. Caretto, A. Laurenzi, M. Scavini, and L. Piemonti. (2019) Low-Carb and Ketogenic Diets in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Nutrients* 11, 962.
- Bölsterli, B.K., E. Boltshauser, L. Palmieri, J. Spenger, M. Brunner-Krainz, F. Distelmaier, P. Freisinger, T. Geis, A.L. Gropman, J. Häberle, J. Hentschel, B. Jeandidier, D. Karall, B. Keren, A. Klabunde-Cherwon, V. Konstantopoulou, R. Kottke, F.M. Lasorsa, C. Makowski, C. Mignot, R. O’Gorman Tuura, V. Porcelli, R. Santer, K. Sen, K. Steinbrücker, S. Syrbe, M. Wagner, A. Ziegler, T. Zöggeler, J.A. Mayr, H. Prokisch, and S.B. Wortmann. (2022) Ketogenic Diet Treatment of Defects in the Mitochondrial Malate Aspartate Shuttle and Pyruvate Carrier. *Nutrients* 14, 3605.
- Bonneville, M., R.L. O’Brien, and W.K. Born. (2010) $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10, 467–478.
- Borregaard, N., and J.B. Cowland. (1997) Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood* 89, 3503–3521.
- Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342.
- Brancato, S.K., and J.E. Albina. (2011) Wound Macrophages as Key Regulators of Repair: Origin, Phenotype, and Function. *The American Journal of Pathology* 178, 19–25.

- Bueno, N.B., I.S.V. de Melo, S.L. de Oliveira, and T. da R. Ataíde. (2013) Very-low-carbohydrate ketogenic diet v. low-fat diet for long-term weight loss: a meta-analysis of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition* 110, 1178–1187.
- de Cabo, R., and M.P. Mattson. (2019) Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. *N Engl J Med* 381, 2541–2551.
- Caffa, I., V. Spagnolo, C. Vernieri, F. Valdemarin, P. Becherini, M. Wei, S. Brandhorst, C. Zucal, E. Driehuis, L. Ferrando, F. Piacente, A. Tagliafico, M. Cilli, L. Mastracci, V.G. Vellone, S. Piazza, A.L. Cremonini, R. Gradaschi, C. Mantero, M. Passalacqua, A. Ballestrero, G. Zoppoli, M. Cea, A. Arrighi, P. Odetti, F. Monacelli, G. Salvadori, S. Cortellino, H. Clevers, F. De Braud, S.G. Sukkar, A. Provenzani, V.D. Longo, and A. Nencioni. (2020) Fasting-mimicking diet and hormone therapy induce breast cancer regression. *Nature* 583, 620–624.
- Cahill, G.F. (2006) Fuel Metabolism in Starvation. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 1–22.
- Cahill, G.F., M.G. Herrera, A.P. Morgan, J.S. Soeldner, J. Steinke, P.L. Levy, G.A. Reichard, and D.M. Kipnis. (1966) Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J Clin Invest* 45, 1751–1769.
- Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein. (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 621–634.
- Casanova-Acebes, M., E. Dalla, A.M. Leader, J. LeBerichel, J. Nikolic, B.M. Morales, M. Brown, C. Chang, L. Troncoso, S.T. Chen, A. Sastre-Perona, M.D. Park, A. Tabachnikova, M. Dhainaut, P. Hamon, B. Maier, C.M. Sawai, E. Agulló-Pascual, M. Schober, B.D. Brown, B. Reizis, T. Marron, E. Kenigsberg, C. Moussion, P. Benaroch, J.A. Aguirre-Ghiso, and M. Merad. (2021) Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells. *Nature* 595, 578–584.
- Chen, S., J. Yang, Y. Wei, and X. Wei. (2020) Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. *Cell Mol Immunol* 17, 36–49.
- Chen, X., I. Barozzi, A. Termanini, E. Prosperini, A. Recchiuti, J. Dalli, F. Mietton, G. Matteoli, S. Hiebert, and G. Natoli. (2012) Requirement for the histone deacetylase Hdac3 for the inflammatory gene expression program in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E2865–E2874.
- Cheng, Y.-Y., Z. Gregorich, R.P. Prajnamitra, D.J. Lundy, T.-Y. Ma, Y.-H. Huang, Y.-C. Lee, S.-C. Ruan, J.-H. Lin, P.-J. Lin, C.-W. Kuo, P. Chen, Y.-T. Yan, R. Tian, T.J. Kamp, and P.C.H. Hsieh. (2022) Metabolic Changes Associated With Cardiomyocyte Dedifferentiation Enable Adult Mammalian Cardiac Regeneration. *Circulation* 146, 1950–1967.
- Chihara, T., S. Suzu, R. Hassan, N. Chutiwitoonchai, M. Hiyoshi, K. Motoyoshi, F. Kimura, and S. Okada. (2010) IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ* 17, 1917–1927.
- Chitu, V., and E.R. Stanley. (2006) Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Current Opinion in Immunology* 18, 39–48.

- Chitu, V., and E.R. Stanley. (2017) Regulation of Embryonic and Postnatal Development by the CSF-1 Receptor. *Curr Top Dev Biol* 123, 229–275.
- Choi, Y.J., S.-M. Jeon, and S. Shin. (2020) Impact of a Ketogenic Diet on Metabolic Parameters in Patients with Obesity or Overweight and with or without Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* 12, 2005.
- Chriett, S., A. Dąbek, M. Wojtala, H. Vidal, A. Balcerczyk, and L. Pirola. (2019) Prominent action of butyrate over β -hydroxybutyrate as histone deacetylase inhibitor, transcriptional modulator and anti-inflammatory molecule. *Sci Rep* 9, 742.
- Colegio, O.R., N.-Q. Chu, A.L. Szabo, T. Chu, A.M. Rhebergen, V. Jairam, N. Cyrus, C.E. Brokowski, S.C. Eisenbarth, G.M. Phillips, G.W. Cline, A.J. Phillips, and R. Medzhitov. (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513, 559–563.
- Colonna, M., and O. Butovsky. (2017) Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol* 35, 441–468.
- Covarrubias, A.J., H.I. Aksoylar, J. Yu, N.W. Snyder, A.J. Worth, S.S. Iyer, J. Wang, I. Ben-Sahra, V. Byles, T. Polynne-Stapornkul, E.C. Espinosa, D. Lamming, B.D. Manning, Y. Zhang, I.A. Blair, and T. Horng. (2016) Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *eLife* 5, e11612.
- Crinier, A., C. Viant, M. Girard-Madoux, and É. Vivier. (2017) Les cellules lymphoïdes innées. *Med Sci (Paris)* 33, 534–542.
- Dai, X.-M., G.R. Ryan, A.J. Hapel, M.G. Dominguez, R.G. Russell, S. Kapp, V. Sylvestre, and E.R. Stanley. (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.
- Daley, J.M., S.K. Brancato, A.A. Thomay, J.S. Reichner, and J.E. Albina. (2010) The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* 87, 59–67.
- Dashti, H.M., T.C. Mathew, T. Hussein, S.K. Asfar, A. Behbahani, M.A. Khoursheed, H.M. Al-Sayer, Y.Y. Bo-Abbas, and N.S. Al-Zaid. (2004) Long-term effects of a ketogenic diet in obese patients. *Exp Clin Cardiol* 9, 200–205.
- Davis, F.M., A. denDekker, A.D. Joshi, S.J. Wolf, C. Audu, W.J. Melvin, K. Mangum, M. O’Riordan, S.L. Kunkel, and K.A. Gallagher. (2020) Palmitate-TLR4 Signaling Regulates the Histone Demethylase, JMJD3, in Macrophages and Impairs Diabetic Wound Healing. *Eur J Immunol* 50, 1929–1940.
- Davis, F.M., and K.A. Gallagher. (2019) Epigenetic Mechanisms in Monocytes/Macrophages Regulate Inflammation in Cardiometabolic and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 39, 623–634.

- De Santa, F., V. Narang, Z.H. Yap, B.K. Tusi, T. Burgold, L. Austenaa, G. Bucci, M. Caganova, S. Notarbartolo, S. Casola, G. Testa, W.-K. Sung, C.-L. Wei, and G. Natoli. (2009) Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. *EMBO J* 28, 3341–3352.
- De Santa, F., M.G. Totaro, E. Prosperini, S. Notarbartolo, G. Testa, and G. Natoli. (2007) The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated Gene Silencing. *Cell* 130, 1083–1094.
- Decot, V., and M. Capron. (2006) Le polynucléaire éosinophile: Structure et fonctions. *La Presse Médicale* 35, 113–124.
- Delneste, Y., C. Beauvillain, and P. Jeannin. (2007) Immunité naturelle - Structure et fonction des Toll-like receptors. *Med Sci (Paris)* 23, 67–74.
- Demidova-Rice, T.N., M.R. Hamblin, and I.M. Herman. (2012) Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. *Adv Skin Wound Care* 25, 304–314.
- Deng, Y., M. Xie, Q. Li, X. Xu, W. Ou, Y. Zhang, H. Xiao, H. Yu, Y. Zheng, Y. Liang, C. Jiang, G. Chen, D. Du, W. Zheng, S. Wang, M. Gong, Y. Chen, R. Tian, and T. Li. (2021) Targeting Mitochondria-Inflammation Circuit by β -Hydroxybutyrate Mitigates HFpEF. *Circulation Research* 128, 232–245.
- Denoon, T., S. Sunilkumar, and S.M. Ford. (2020) Acetoacetate enhances oxidative metabolism and response to toxicants of cultured kidney cells. *Toxicology Letters* 323, 19–24.
- Diskin, C., and E.M. Pålsson-McDermott. (2018) Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Frontiers in Immunology* 9, .
- Divakaruni, A.S., W.Y. Hsieh, L. Minarrieta, T.N. Duong, K.K.O. Kim, B.R. Desousa, A.Y. Andreyev, C.E. Bowman, K. Caradonna, B.P. Dranka, D.A. Ferrick, M. Liesa, L. Stiles, G.W. Rogers, D. Braas, T.P. Ciaraldi, M.J. Wolfgang, T. Sparwasser, L. Berod, S.J. Bensinger, and A.N. Murphy. (2018) Etomoxir Inhibits Macrophage Polarization by Disrupting CoA Homeostasis. *Cell Metab* 28, 490-503.e7.
- Divangahi, M., P. Aaby, S.A. Khader, L.B. Barreiro, S. Bekkering, T. Chavakis, R. van Crevel, N. Curtis, A.R. DiNardo, J. Dominguez-Andres, R. Duivenwoorden, S. Fanucchi, Z. Fayad, E. Fuchs, M. Hamon, K.L. Jeffrey, N. Khan, L.A.B. Joosten, E. Kaufmann, E. Latz, G. Matarese, J.W.M. van der Meer, M. Mhlanga, S.J.C.F.M. Moorlag, W.J.M. Mulder, S. Naik, B. Novakovic, L. O’Neill, J. Ochando, K. Ozato, N.P. Riksen, R. Sauerwein, E.R. Sherwood, A. Schlitzer, J.L. Schultze, M.H. Sieweke, C.S. Benn, H. Stunnenberg, J. Sun, F.L. van de Veerdonk, S. Weis, D.L. Williams, R. Xavier, and M.G. Netea. (2021) Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nat Immunol* 22, 2–6.
- Dunkelberger, J.R., and W.-C. Song. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20, 34–50.

- Dyńska, D., K. Kowalcze, and A. Paziewska. (2022) The Role of Ketogenic Diet in the Treatment of Neurological Diseases. *Nutrients* 14, 5003.
- Elliott, M.R., and K.S. Ravichandran. (2010) Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 189, 1059–1070.
- Ellis, S., E.J. Lin, and D. Tartar. (2018) Immunology of Wound Healing. *Curr Dermatol Rep* 7, 350–358.
- Eming, S.A., S. Werner, P. Bugnon, C. Wickenhauser, L. Siewe, O. Utermöhlen, J.M. Davidson, T. Krieg, and A. Roers. (2007) Accelerated Wound Closure in Mice Deficient for Interleukin-10. *The American Journal of Pathology* 170, 188–202.
- Eming, S.A., T.A. Wynn, and P. Martin. (2017) Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* 356, 1026–1030.
- Endo, Y., M. Matsushita, and T. Fujita. (2011) The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 705–712.
- Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph. (2014) Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, and P.M. Henson. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890–898.
- Fanucchi, S., J. Domínguez-Andrés, L.A.B. Joosten, M.G. Netea, and M.M. Mhlanga. (2021) The Intersection of Epigenetics and Metabolism in Trained Immunity. *Immunity* 54, 32–43.
- Fisher, F.M., and E. Maratos-Flier. (2016) Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol* 78, 223–241.
- Flannagan, R.S., B. Heit, and D.E. Heinrichs. (2015) Antimicrobial Mechanisms of Macrophages and the Immune Evasion Strategies of *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 4, 826–868.
- Foster, S.L., D.C. Hargreaves, and R. Medzhitov. (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447, 972–978.
- Freemerman, A.J., A.R. Johnson, G.N. Sacks, J.J. Milner, E.L. Kirk, M.A. Troester, A.N. Macintyre, P. Goraksha-Hicks, J.C. Rathmell, and L. Makowski. (2014) Metabolic Reprogramming of Macrophages: GLUCOSE TRANSPORTER 1 (GLUT1)-MEDIATED GLUCOSE METABOLISM DRIVES A PROINFLAMMATORY PHENOTYPE *. *Journal of Biological Chemistry* 289, 7884–7896.
- Frey, S., G. Geffroy, V. Desquirit-Dumas, N. Gueguen, C. Bris, S. Belal, P. Amati-Bonneau, A. Chevrollier, M. Barth, D. Henrion, G. Lenaers, D. Bonneau, P. Reynier, and V. Procaccio. (2017) The addition of ketone bodies alleviates mitochondrial dysfunction by restoring complex I assembly in a MELAS cellular model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863, 284–291.

- Fukao, T., G.D. Lopaschuk, and G.A. Mitchell. (2004) Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70, 243–251.
- van Furth, R., and Z.A. Cohn. (1968) THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES. *J Exp Med* 128, 415–435.
- Gabrilovich, D.I. (2017) Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunology Research* 5, 3–8.
- Gabrilovich, D.I., and S. Nagaraj. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162–174.
- Galván-Peña, S., and L.A.J. O’Neill. (2014) Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* 5, 420.
- Gambhir, D., S. Ananth, R. Veeranan-Karmegam, S. Elangovan, S. Hester, E. Jennings, S. Offermanns, J.J. Nussbaum, S.B. Smith, M. Thangaraju, V. Ganapathy, and P.M. Martin. (2012) GPR109A as an Anti-Inflammatory Receptor in Retinal Pigment Epithelial Cells and Its Relevance to Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53, 2208–2217.
- Gardner, C.D., M.J. Landry, D. Perelman, C. Petlura, L.R. Durand, L. Aronica, A. Crimarco, K.M. Cunanan, A. Chang, C.C. Dant, J.L. Robinson, and S.H. Kim. (2022) Effect of a ketogenic diet versus Mediterranean diet on glycated hemoglobin in individuals with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: The interventional Keto-Med randomized crossover trial. *Am J Clin Nutr* 116, 640–652.
- Geeraerts, X., E. Bolli, S.-M. Fendt, and J.A. Van Genderachter. (2017) Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. *Frontiers in Immunology* 8, .
- Gentles, A.J., A.M. Newman, C.L. Liu, S.V. Bratman, W. Feng, D. Kim, V.S. Nair, Y. Xu, A. Khuong, C.D. Hoang, M. Diehn, R.B. West, S.K. Plevritis, and A.A. Alizadeh. (2015) The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 21, 938–945.
- Georgoudaki, A.-M., K.E. Prokopec, V.F. Boura, E. Hellqvist, S. Sohn, J. Östling, R. Dahan, R.A. Harris, M. Rantalainen, D. Klevebring, M. Sund, S.E. Brage, J. Fuxe, C. Rolny, F. Li, J.V. Ravetch, and M.C.I. Karlsson. (2016) Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis. *Cell Reports* 15, 2000–2011.
- Giese, M.A., L.E. Hind, and A. Huttenlocher. (2019) Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood* 133, 2159–2167.
- Ginhoux, F., and M. Williams. (2016) Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449.
- Godfrey, D.I., S. Stankovic, and A.G. Baxter. (2010) Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* 11, 197–206.

- Goldberg, E.L., J.L. Asher, R.D. Molony, A.C. Shaw, C.J. Zeiss, C. Wang, L.A. Morozova-Roche, R.I. Herzog, A. Iwasaki, and V.D. Dixit. (2017) β -Hydroxybutyrate Deactivates Neutrophil NLRP3 Inflammasome to Relieve Gout Flares. *Cell Reports* 18, 2077–2087.
- Gonzalez-Hurtado, E., J. Lee, J. Choi, E.S. Selen Alpergin, S.L. Collins, M.R. Horton, and M.J. Wolfgang. (2017) Loss of macrophage fatty acid oxidation does not potentiate systemic metabolic dysfunction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 312, E381–E393.
- Gore, D.C., D. Chinkes, J. Hegggers, D.N. Herndon, S.E. Wolf, and M. Desai. (2001) Association of Hyperglycemia with Increased Mortality after Severe Burn Injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 51, 540.
- Gore, D.C., A. Ferrando, J. Barnett, S.E. Wolf, M. Desai, D.N. Herndon, C. Goodwin, and R.R. Wolfe. (2000) Influence of glucose kinetics on plasma lactate concentration and energy expenditure in severely burned patients. *J Trauma* 49, 673–677; discussion 677-678.
- Goren, I., N. Allmann, N. Yogev, C. Schürmann, A. Linke, M. Holdener, A. Waisman, J. Pfeilschifter, and S. Frank. (2009) A Transgenic Mouse Model of Inducible Macrophage Depletion. *Am J Pathol* 175, 132–147.
- Gough, P.J., and S. Gordon. (2000) The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and Infection* 2, 305–311.
- Grabacka, M., M. Pierzchalska, M. Dean, and K. Reiss. (2016) Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPAR α . *International Journal of Molecular Sciences* 17, 2093.
- Gurtner, G.C., S. Werner, Y. Barrandon, and M.T. Longaker. (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314–321.
- Habib, N., M.A. Pasha, and D.D. Tang. (2022) Current Understanding of Asthma Pathogenesis and Biomarkers. *Cells* 11, 2764.
- Halbrook, C.J., C. Pontious, I. Kovalenko, L. Lapienyte, S. Dreyer, H.-J. Lee, G. Thurston, Y. Zhang, J. Lazarus, P. Sajjakulnukit, H.S. Hong, D.M. Kremer, B.S. Nelson, S. Kemp, L. Zhang, D. Chang, A. Biankin, J. Shi, T.L. Frankel, H.C. Crawford, J.P. Morton, M. Pasca di Magliano, and C.A. Lyssiotis. (2019) Macrophage-Released Pyrimidines Inhibit Gemcitabine Therapy in Pancreatic Cancer. *Cell Metabolism* 29, 1390-1399.e6.
- Halestrap, A.P., and M.C. Wilson. (2012) The monocarboxylate transporter family—Role and regulation. *IUBMB Life* 64, 109–119.
- Hamilton, J.A. (2008) Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 8, 533–544.
- Hashimoto, D., A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M.B. Beasley, M. Leboeuf, C.D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S.W. Boyer, E.C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. García-Sastre, E.R. Stanley, F. Ginhoux, P.S. Frenette, and M. Merad. (2013) Tissue-resident

- macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.
- Hassanshahi, A., M. Moradzad, S. Ghalamkari, M. Fadaei, A.J. Cowin, and M. Hassanshahi. (2022) Macrophage-Mediated Inflammation in Skin Wound Healing. *Cells* 11, 2953.
- van Hasselt, P.M., S. Ferdinandusse, G.R. Monroe, J.P.N. Ruiter, M. Turkenburg, M.J. Geerlings, K. Duran, M. Harakalova, B. van der Zwaag, A.A. Monavari, I. Okur, M.J. Sharrard, M. Cleary, N. O’Connell, V. Walker, M.E. Rubio-Gozalbo, M.C. de Vries, G. Visser, R.H.J. Houwen, J.J. van der Smagt, N.M. Verhoeven-Duif, R.J.A. Wanders, and G. van Haaften. (2014) Monocarboxylate Transporter 1 Deficiency and Ketone Utilization. *N Engl J Med* 371, 1900–1907.
- Hegde, S., A.M. Leader, and M. Merad. (2021) MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. *Immunity* 54, 875–884.
- Helft, J., J. Böttcher, P. Chakravarty, S. Zelenay, J. Huotari, B.U. Schraml, D. Goubau, and C. Reis e Sousa. (2015) GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 42, 1197–1211.
- Herold, S., K. Mayer, and J. Lohmeyer. (2011) Acute Lung Injury: How Macrophages Orchestrate Resolution of Inflammation and Tissue Repair. *Frontiers in Immunology* 2, .
- Hoeffel, G., and F. Ginhoux. (2018) Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cellular Immunology* 330, 5–15.
- Hoeksema, M.A., M.J. Gijbels, J. Van den Bossche, S. van der Velden, A. Sijm, A.E. Neele, T. Seijkens, J.L. Stöger, S. Meiler, M.C. Boshuizen, G.M. Dallinga-Thie, J.H. Levels, L. Boon, S.E. Mullican, N.J. Spann, J.P. Cleutjens, C.K. Glass, M.A. Lazar, C.J. de Vries, E.A. Biessen, M.J. Daemen, E. Lutgens, and M.P. de Winther. (2014) Targeting macrophage Histone deacetylase 3 stabilizes atherosclerotic lesions. *EMBO Mol Med* 6, 1124–1132.
- Hoeksema, M.A., and M.P.J. de Winther. (2016) Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. *Antioxid Redox Signal* 25, 758–774.
- Horton, J.L., M.T. Davidson, C. Kurishima, R.B. Vega, J.C. Powers, T.R. Matsuura, C. Petucci, E.D. Lewandowski, P.A. Crawford, D.M. Muoio, F.A. Recchia, and D.P. Kelly. (2019) The failing heart utilizes 3-hydroxybutyrate as a metabolic stress defense. *JCI Insight* 4, e124079, 124079.
- Houri Levi, E., A. Watad, A. Whitby, S. Tiosano, D. Comaneshter, A.D. Cohen, and H. Amital. (2016) Coexistence of ischemic heart disease and rheumatoid arthritis patients—A case control study. *Autoimmunity Reviews* 15, 393–396.
- Hovav, A.-H. (2017) Human $\gamma\delta$ T cells: rapid, stable and clonally reactive. *Cell Mol Immunol* 14, 646–648.
- Huang, H., D. Zhang, Y. Weng, K. Delaney, Z. Tang, C. Yan, S. Qi, C. Peng, P.A. Cole, R.G. Roeder, and Y. Zhao. (2021) The regulatory enzymes and protein substrates for the lysine β -hydroxybutyrylation pathway. *Science Advances* 7, eabe2771.

- Huang, S.-M., C.-S. Wu, M.-H. Chiu, C.-H. Wu, Y.-T. Chang, G.-S. Chen, and C.-C.E. Lan. (2019) High glucose environment induces M1 macrophage polarization that impairs keratinocyte migration via TNF- α : An important mechanism to delay the diabetic wound healing. *Journal of Dermatological Science* 96, 159–167.
- Huen, S.C., A. Wang, K. Feola, R. Desrouleaux, H.H. Luan, R. Hogg, C. Zhang, Q.-J. Zhang, Z.-P. Liu, and R. Medzhitov. (2021) Hepatic FGF21 preserves thermoregulation and cardiovascular function during bacterial inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 218, e20202151.
- Hussell, T., and T.J. Bell. (2014) Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 14, 81–93.
- Ishii, M., H. Wen, C.A.S. Corsa, T. Liu, A.L. Coelho, R.M. Allen, W.F. Carson IV, K.A. Cavassani, X. Li, N.W. Lukacs, C.M. Hogaboam, Y. Dou, and S.L. Kunkel. (2009) Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood* 114, 3244–3254.
- Izquierdo, E., V.D. Cuevas, S. Fernández-Arroyo, M. Riera-Borrull, E. Orta-Zavalza, J. Joven, E. Rial, A.L. Corbi, and M.M. Escribese. (2015) Reshaping of Human Macrophage Polarization through Modulation of Glucose Catabolic Pathways. *The Journal of Immunology* 195, 2442–2451.
- Jalil, A.R., J.C. Andrechak, and D.E. Discher. (2020) Macrophage checkpoint blockade: results from initial clinical trials, binding analyses, and CD47-SIRP α structure-function. *Antib Ther* 3, 80–94.
- Jayedji, A., S. Zeraattalab-Motlagh, B. Jabbarzadeh, Y. Hosseini, A.T. Jibril, H. Shahinfar, A. Mirrafiei, F. Hosseini, and S. Shab-Bidar. (2022) Dose-dependent effect of carbohydrate restriction for type 2 diabetes management: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* 116, 40–56.
- Jeannin, P., L. Paolini, C. Adam, and Y. Delneste. (2018) The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *FEBS J.* 285, 680–699.
- Kang, H.-B., J. Fan, R. Lin, S. Elf, Q. Ji, L. Zhao, L. Jin, J.H. Seo, C. Shan, J.L. Arbiser, C. Cohen, D. Brat, H.M. Miziorko, E. Kim, O. Abdel-Wahab, T. Merghoub, S. Fröhling, C. Scholl, P. Tamayo, D.A. Barbie, L. Zhou, B.P. Pollack, K. Fisher, R.R. Kudchadkar, D.H. Lawson, G. Sica, M. Rossi, S. Lonial, H.J. Khoury, F.R. Khuri, B.H. Lee, T.J. Boggon, C. He, S. Kang, and J. Chen. (2015) Metabolic Rewiring by Oncogenic BRAF V600E Links Ketogenesis Pathway to BRAF-MEK1 Signaling. *Molecular Cell* 59, 345–358.
- Karasuyama, H., K. Obata, T. Wada, Y. Tsujimura, and K. Mukai. (2011) Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. *Allergy* 66, 1133–1141.
- Kashfi, K., J. Kannikal, and N. Nath. (2021) Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO. *Cells* 10, 3194.
- Kashiwaya, Y., T. Takeshima, N. Mori, K. Nakashima, K. Clarke, and R.L. Veech. (2000) d- β -Hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 5440–5444.

- Kawai, T., and S. Akira. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373–384.
- Khanna, S., S. Biswas, Y. Shang, E. Collard, A. Azad, C. Kauh, V. Bhasker, G.M. Gordillo, C.K. Sen, and S. Roy. (2010) Macrophage Dysfunction Impairs Resolution of Inflammation in the Wounds of Diabetic Mice. *PLoS One* 5, e9539.
- Kimura, I., D. Inoue, T. Maeda, T. Hara, A. Ichimura, S. Miyauchi, M. Kobayashi, A. Hirasawa, and G. Tsujimoto. (2011) Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 8030–8035.
- Klein, I., J.C. Cornejo, N.K. Polakos, B. John, S.A. Wuensch, D.J. Topham, R.H. Pierce, and I.N. Crispe. (2007) Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 110, 4077–4085.
- Kleinnijenhuis, J., J. Quintin, F. Preijers, L.A.B. Joosten, D.C. Iffrim, S. Saeed, C. Jacobs, J. van Loenhout, D. de Jong, H.G. Stunnenberg, R.J. Xavier, J.W.M. van der Meer, R. van Crevel, and M.G. Netea. (2012) Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17537–17542.
- Klement, R.J. (2018) Fasting, Fats, and Physics: Combining Ketogenic and Radiation Therapy against Cancer. *Complementary Medicine Research* 25, 102–113.
- Kobayashi, Y. (2015) Neutrophil biology: an update. *EXCLI J* 14, 220–227.
- Koeslag, J.H. (1980) Daily blood ketone body concentrations after acute exercise. *S Afr Med J* 57, 125–127.
- Koh, T.J., and L.A. DiPietro. (2011) Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 13, e23.
- Kolls, J.K., and A. Lindén. (2004) Interleukin-17 Family Members and Inflammation. *Immunity* 21, 467–476.
- Kowal, J., M. Kornete, and J.A. Joyce. (2019) Re-education of macrophages as a therapeutic strategy in cancer. *Immunotherapy* 11, 677–689.
- Kruidenier, L., C. Chung, Z. Cheng, J. Liddle, K. Che, G. Joberty, M. Bantscheff, C. Bountra, A. Bridges, H. Diallo, D. Eberhard, S. Hutchinson, E. Jones, R. Katso, M. Leveridge, P.K. Mander, J. Mosley, C. Ramirez-Molina, P. Rowland, C.J. Schofield, R.J. Sheppard, J.E. Smith, C. Swales, R. Tanner, P. Thomas, A. Tumber, G. Drewes, U. Oppermann, D.J. Patel, K. Lee, and D.M. Wilson. (2012) A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* 488, 404–408.

- Krzyszczuk, P., R. Schloss, A. Palmer, and F. Berthiaume. (2018) The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol* 9, 419.
- Kumar, V., A. Abbas, and J. C.Aster. (2020) Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Pathologic Basis of Disease .
- Langers, I., V.M. Renoux, M. Thiry, P. Delvenne, and N. Jacobs. (2012) Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *Biologics* 6, 73–82.
- Larsen, S.B., C.J. Cowley, and E. Fuchs. (2020) Epithelial cells: liaisons of immunity. *Curr Opin Immunol* 62, 45–53.
- Lee, A.K., D.H. Kim, E. Bang, Y.J. Choi, and H.Y. Chung. (2020) β -Hydroxybutyrate Suppresses Lipid Accumulation in Aged Liver through GPR109A-mediated Signaling. *Aging Dis* 11, 777–790.
- Leibovich, S.J., and R. Ross. (1975) The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78, 71–100.
- Li, B., Y. Yu, K. Liu, Y. Zhang, Q. Geng, F. Zhang, Y. Li, and J. Qi. (2021) β -Hydroxybutyrate inhibits histone deacetylase 3 to promote claudin-5 generation and attenuate cardiac microvascular hyperpermeability in diabetes. *Diabetologia* 64, 226–239.
- Li, S., G. Lin, J. Chen, Z. Chen, F. Xu, F. Zhu, J. Zhang, and S. Yuan. (2022) The effect of periodic ketogenic diet on newly diagnosed overweight or obese patients with type 2 diabetes. *BMC Endocr Disord* 22, 34.
- Liang, Z., Q. Zhang, C.M. Thomas, K.K. Chana, D. Gibeon, P.J. Barnes, K.F. Chung, P.K. Bhavsar, and L.E. Donnelly. (2014) Impaired macrophage phagocytosis of bacteria in severe asthma. *Respir Res* 15, 72.
- Liew, P.X., and P. Kubers. (2019) The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev* 99, 1223–1248.
- Lim, S., G. Caramori, K. Tomita, E. Jazrawi, T. Oates, K.F. Chung, P.J. Barnes, and I.M. Adcock. (2004) Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy* 59, 505–514.
- Lin, H., E. Lee, K. Hestir, C. Leo, M. Huang, E. Bosch, R. Halenbeck, G. Wu, A. Zhou, D. Behrens, D. Hollenbaugh, T. Linnemann, M. Qin, J. Wong, K. Chu, S.K. Doberstein, and L.T. Williams. (2008) Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320, 807–811.
- Liu, H., Y. Yang, Y. Wang, H. Tang, F. Zhang, Y. Zhang, and Y. Zhao. (2018) Ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy in adults: A meta-analysis of observational studies. *Epilepsia Open* 3, 9–17.

- Liu, P.-S., H. Wang, X. Li, T. Chao, T. Teav, S. Christen, G.D. Conza, W.-C. Cheng, C.-H. Chou, M. Vavakova, C. Muret, K. Debackere, M. Mazzone, H.-D. Huang, S.-M. Fendt, J. Ivanisevic, and P.-C. Ho. (2017) α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol* 18, 985–994.
- Locati, M., G. Curtale, and A. Mantovani. (2020) Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol* 15, 123–147.
- Louiselle, A.E., S.M. Niemiec, C. Zgheib, and K.W. Liechty. (2021) Macrophage polarization and diabetic wound healing. *Transl Res* 236, 109–116.
- Loyher, P.-L., P. Hamon, M. Laviron, A. Meghraoui-Kheddar, E. Goncalves, Z. Deng, S. Torstensson, N. Bercovici, C. Baudesson de Chanville, B. Combadière, F. Geissmann, A. Savina, C. Combadière, and A. Boissonnas. (2018) Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *J Exp Med* 215, 2536–2553.
- Lucas, T., A. Waisman, R. Ranjan, J. Roes, T. Krieg, W. Müller, A. Roers, and S.A. Eming. (2010) Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 184, 3964–3977.
- Luda, K.M., J. Longo, S.M. Kitchen-Goosen, L.R. Duimstra, E.H. Ma, M.J. Watson, B.M. Oswald, Z. Fu, Z. Madaj, A. Kupai, B.M. Dickson, L.M. DeCamp, M.S. Dahabieh, S.E. Compton, R. Teis, I. Kaymak, K.H. Lau, D.P. Kelly, P. Puchalska, K.S. Williams, C.M. Krawczyk, D. Lévesque, F.-M. Boisvert, R.D. Sheldon, S.B. Rothbart, P.A. Crawford, and R.G. Jones. (2023) Ketolysis drives CD8+ T cell effector function through effects on histone acetylation. *Immunity* .
- Maassen, S., B. Coenen, M. Ioannidis, K. Harber, P. Grijpstra, J. Van den Bossche, and G. van den Bogaart. (2022) Itaconate promotes a wound resolving phenotype in pro-inflammatory macrophages. *Redox Biol* 59, 102591.
- Madsen, D.H., D. Leonard, A. Masedunskas, A. Moyer, H.J. Jürgensen, D.E. Peters, P. Amornphimoltham, A. Selvaraj, S.S. Yamada, D.A. Brenner, S. Burgdorf, L.H. Engelholm, N. Behrendt, K. Holmbeck, R. Weigert, and T.H. Bugge. (2013) M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor–mediated pathway. *Journal of Cell Biology* 202, 951–966.
- Mantegazza, A.R., J.G. Magalhaes, S. Amigorena, and M.S. Marks. (2013) Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic* 14, 135–152.
- Mantovani, A., P. Allavena, F. Marchesi, and C. Garlanda. (2022) Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 21, 799–820.
- Mantovani, A., F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi, and P. Allavena. (2017) Tumor-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 399–416.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.

- Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23, 549–555.
- Mårtensson, J., L. Björkman, S. Lind, M.B. Viklund, L. Zhang, S. Gutierrez, C. Dahlgren, M. Sundqvist, X. Xie, and H. Forsman. (2023) The ketone body acetoacetate activates human neutrophils through FFAR2. *Journal of Leukocyte Biology* 113, 577–587.
- Martin, P. (1997) Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 276, 75–81.
- Martinez, F.O., S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani. (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311.
- Matozaki, T., Y. Murata, H. Okazawa, and H. Ohnishi. (2009) Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 19, 72–80.
- Matsuura, T.R., P. Puchalska, P.A. Crawford, and D.P. Kelly. (2023) Ketones and the Heart: Metabolic Principles and Therapeutic Implications. *Circulation Research* 132, 882–898.
- Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell. (2014) The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol* 9, 181–218.
- McDonald, T.J.W., and M.C. Cervenka. (2018) Ketogenic Diets for Adult Neurological Disorders. *Neurotherapeutics* 15, 1018–1031.
- McGarry, J.D., and D.W. Foster. (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem* 49, 395–420.
- Medzhitov, R., D.S. Schneider, and M.P. Soares. (2012) Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science* 335, 936–941.
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. (2013) The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu Rev Immunol* 31, 10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
- Meszaros, A.J., J.S. Reichner, and J.E. Albina. (2000) Macrophage-Induced Neutrophil Apoptosis¹. *The Journal of Immunology* 165, 435–441.
- Miao, M., Y. Niu, T. Xie, B. Yuan, C. Qing, and S. Lu. (2012) Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: A possible pathophysiologic correlation. *Wound Repair and Regeneration* 20, 203–213.
- Miller, V.J., R.A. LaFountain, E. Barnhart, T.S. Sapper, J. Short, W.D. Arnold, P.N. Hyde, C.D. Crabtree, M.L. Kackley, W.J. Kraemer, F.A. Villamena, and J.S. Volek. (2020) A ketogenic diet combined with exercise alters mitochondrial function in human skeletal muscle while improving metabolic health. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 319, E995–E1007.

- Minutti, C.M., and J.A. Knipper. (2017) Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 61, 3–11.
- Mirza, R., L.A. DiPietro, and T.J. Koh. (2009) Selective and Specific Macrophage Ablation Is Detrimental to Wound Healing in Mice. *Am J Pathol* 175, 2454–2462.
- Mirza, R., and T.J. Koh. (2011) Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. *Cytokine* 56, 256–264.
- Mirza, R.E., M.M. Fang, W.J. Ennis, and T.J. Koh. (2013) Blocking Interleukin-1 β Induces a Healing-Associated Wound Macrophage Phenotype and Improves Healing in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 62, 2579–2587.
- Monnier, M., L. Paolini, E. Vinatier, A. Mantovani, Y. Delneste, and P. Jeannin. (2022) Antitumor strategies targeting macrophages: the importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages. *J Immunother Cancer* 10, e005560.
- Moore, K.J., F.J. Sheedy, and E.A. Fisher. (2013) Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 13, 709–721.
- Moore, K.J., and I. Tabas. (2011) Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell* 145, 341–355.
- Morikawa, M., R. Derynck, and K. Miyazono. (2016) TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a021873.
- Morscher, R.J., S. Aminzadeh-Gohari, R.G. Feichtinger, J.A. Mayr, R. Lang, D. Neureiter, W. Sperl, and B. Kofler. (2015) Inhibition of Neuroblastoma Tumor Growth by Ketogenic Diet and/or Calorie Restriction in a CD1-Nu Mouse Model. *PLOS ONE* 10, e0129802.
- Mosmann, T.R., H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, and R.L. Coffman. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348–2357.
- Mosser, D.M., and J.P. Edwards. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958–969.
- Mullican, S.E., C.A. Gaddis, T. Alenghat, M.G. Nair, P.R. Giacomini, L.J. Everett, D. Feng, D.J. Steger, J. Schug, D. Artis, and M.A. Lazar. (2011) Histone deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation. *Genes Dev* 25, 2480–2488.
- Municio, C., and G. Criado. (2021) Therapies Targeting Trained Immune Cells in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 11, 631743.
- Murray, P.J., J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J.A. Hamilton, L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J.-L. Mege, D.M. Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, J.L. Schultze, K.A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J.A. van Ginderachter,

- S.N. Vogel, and T.A. Wynn. (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41, 14–20.
- Murray, P.J., and T.A. Wynn. (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723–737.
- Muscogiuri, G., L. Barrea, D. Laudisio, G. Pugliese, C. Salzano, S. Savastano, and A. Colao. (2019) The management of very low-calorie ketogenic diet in obesity outpatient clinic: a practical guide. *J Transl Med* 17, 1–9.
- Na, J., K. Lee, W. Na, J.-Y. Shin, M.-J. Lee, T.Y. Yune, H.K. Lee, H.-S. Jung, W.S. Kim, and B.-G. Ju. (2016) Histone H3K27 Demethylase JMJD3 in Cooperation with NF- κ B Regulates Keratinocyte Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology* 136, 847–858.
- Nadif, R., F. Zerimech, E. Bouzigon, and R. Matran. (2013) The role of eosinophils and basophils in allergic diseases considering genetic findings. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 13, 507.
- Nandi, S., M. Cioce, Y.-G. Yeung, E. Nieves, L. Tesfa, H. Lin, A.W. Hsu, R. Halenbeck, H.-Y. Cheng, S. Gokhan, M.F. Mehler, and E.R. Stanley. (2013) Receptor-type Protein-tyrosine Phosphatase ζ Is a Functional Receptor for Interleukin-34 *. *Journal of Biological Chemistry* 288, 21972–21986.
- Neal, E.G., H. Chaffe, R.H. Schwartz, M.S. Lawson, N. Edwards, G. Fitzsimmons, A. Whitney, and J.H. Cross. (2008) The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *The Lancet Neurology* 7, 500–506.
- Netea, M.G., L.A.B. Joosten, E. Latz, K.H.G. Mills, G. Natoli, H.G. Stunnenberg, L.A.J. O’Neill, and R.J. Xavier. (2016) Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352, aaf1098.
- Netea, M.G., J. Quintin, and J.W.M. van der Meer. (2011) Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host & Microbe* 9, 355–361.
- Neudorf, H., É. Myette-Côté, and J. P. Little. (2020) The Impact of Acute Ingestion of a Ketone Monoester Drink on LPS-Stimulated NLRP3 Activation in Humans with Obesity. *Nutrients* 12, 854.
- Newman, J.C., A.J. Covarrubias, and M. Zhao. (2017) Ketogenic Diet Reduces Midlife Mortality and Improves Memory in Aging Mice. *Cell Metab.* 26, 547-557.e8.
- Newman, J.C., and E. Verdin. (2014) Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 42–52.
- Newman, J.C., and E. Verdin. (2017) β -Hydroxybutyrate. *Annu Rev Nutr* 37, 51–76.
- Nguyen-Lefebvre, A.T., and A. Horuzsko. (2015) Kupffer Cell Metabolism and Function. *J Enzymol Metab* 1, 101.

- Noe, J.T., B.E. Rendon, A.E. Geller, L.R. Conroy, S.M. Morrissey, L.E.A. Young, R.C. Bruntz, E.J. Kim, A. Wise-Mitchell, M. Barbosa de Souza Rizzo, E.R. Relich, B.V. Baby, L.A. Johnson, H.C. Affronti, K.M. McMasters, B.F. Clem, M.S. Gentry, J. Yan, K.E. Wellen, R.C. Sun, and R.A. Mitchell. (2021) Lactate supports a metabolic-epigenetic link in macrophage polarization. *Science Advances* 7, eabi8602.
- Ochando, J., W.J.M. Mulder, J.C. Madsen, M.G. Netea, and R. Duivenvoorden. (2023) Trained immunity — basic concepts and contributions to immunopathology. *Nat Rev Nephrol* 19, 23–37.
- O’Neill, L.A.J., and M.N. Artyomov. (2019) Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. *Nat Rev Immunol* 19, 273–281.
- O’Neill, L.A.J., and E.J. Pearce. (2016) Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 213, 15–23.
- Ota, M., J. Matsuo, I. Ishida, H. Takano, Y. Yokoi, H. Hori, S. Yoshida, K. Ashida, K. Nakamura, T. Takahashi, and H. Kunugi. (2019) Effects of a medium-chain triglyceride-based ketogenic formula on cognitive function in patients with mild-to-moderate Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett* 690, 232–236.
- Otsuka, M., G. Egawa, and K. Kabashima. (2018) Uncovering the Mysteries of Langerhans Cells, Inflammatory Dendritic Epidermal Cells, and Monocyte-Derived Langerhans Cell-Like Cells in the Epidermis. *Front Immunol* 9, 1768.
- Owen, O.E., P. Felig, A.P. Morgan, J. Wahren, and G.F. Cahill. (1969) Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48, 574–583.
- Paoli, A., A. Rubini, J.S. Volek, and K.A. Grimaldi. (2013) Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *Eur J Clin Nutr* 67, 789–796.
- Paolini, L., C. Adam, C. Beauvillain, L. Preisser, S. Blanchard, P. Pignon, V. Seegers, L.-M. Chevalier, M. Campone, R. Wernert, V. Verrielle, P. Raro, N. Ifrah, V. Lavoué, P. Descamps, A. Morel, V. Catros, G. Tcherkez, G. Lenaers, C. Bocca, J. Kouassi Nzoughet, V. Procaccio, Y. Delneste, and P. Jeannin. (2020) Lactic Acidosis Together with GM-CSF and M-CSF Induces Human Macrophages toward an Inflammatory Protumor Phenotype. *Cancer Immunology Research* 8, 383–395.
- Papayannopoulos, V. (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 18, 134–147.
- Parisi, L., E. Gini, D. Baci, M. Tremolati, M. Fanuli, B. Bassani, G. Farronato, A. Bruno, and L. Mortara. (2018) Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res* 2018, 8917804.
- Pearce, E.L., and E.J. Pearce. (2013) Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity* 38, 633–643.

- Pedersen, K.J. (1929) THE KETONIC DECOMPOSITION OF BETA-KETO CARBOXYLIC ACIDS. *J. Am. Chem. Soc.* 51, 2098–2107.
- Peranzoni, E., S. Zilio, I. Marigo, L. Dolcetti, P. Zanovello, S. Mandruzzato, and V. Bronte. (2010) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current Opinion in Immunology* 22, 238–244.
- Perera Molligoda Arachchige, A.S. (2021) Human NK cells: From development to effector functions. *Innate Immun* 27, 212–229.
- Phillips, M.C.L., L.M. Deprez, G.M.N. Mortimer, D.K.J. Murtagh, S. McCoy, R. Mylchreest, L.J. Gilbertson, K.M. Clark, P.V. Simpson, E.J. McManus, J.-E. Oh, S. Yadavaraj, V.M. King, A. Pillai, B. Romero-Ferrando, M. Brinkhuis, B.M. Copeland, S. Samad, S. Liao, and J.A.C. Schepel. (2021) Randomized crossover trial of a modified ketogenic diet in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Research & Therapy* 13, 51.
- Pinhal-Enfield, G., M. Ramanathan, G. Hasko, S.N. Vogel, A.L. Salzman, G.-J. Boons, and S.J. Leibovich. (2003) An Angiogenic Switch in Macrophages Involving Synergy between Toll-Like Receptors 2, 4, 7, and 9 and Adenosine A2A Receptors. *Am J Pathol* 163, 711–721.
- Ponzoni, M., F. Pastorino, D. Di Paolo, P. Perri, and C. Brignole. (2018) Targeting Macrophages as a Potential Therapeutic Intervention: Impact on Inflammatory Diseases and Cancer. *Int J Mol Sci* 19, 1953.
- Puchalska, P., and P.A. Crawford. (2017) Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism* 25, 262–284.
- Puchalska, P., and P.A. Crawford. (2021) Metabolic and Signaling Roles of Ketone Bodies in Health and Disease. *Annu Rev Nutr* 41, 49–77.
- Puchalska, P., S.E. Martin, X. Huang, J.E. Lengfeld, B. Daniel, M.J. Graham, X. Han, L. Nagy, G.J. Patti, and P.A. Crawford. (2019) Hepatocyte-Macrophage Acetoacetate Shuttle Protects against Tissue Fibrosis. *Cell Metabolism* 29, 383-398.e7.
- QUANT, P.A., D. ROBIN, P. ROBIN, J. GIRARD, and M.D. BRAND. (1989) Control of acetoacetate production from exogenous palmitoyl-CoA in isolated rat liver mitochondria. *Biochemical Society Transactions* 17, 1089–1090.
- Raes, G., R. Van den Bergh, P. De Baetselier, and G.H. Ghassebeh. (2005) Arginase-1 and Ym1 Are Markers for Murine, but Not Human, Alternatively Activated Myeloid Cells. *The Journal of Immunology* 174, 6561–6562.
- Rahman, M., S. Muhammad, M.A. Khan, H. Chen, D.A. Ridder, H. Müller-Fielitz, B. Pokorná, T. Vollbrandt, I. Stölting, R. Nadrowitz, J.G. Okun, S. Offermanns, and M. Schwaninger. (2014) The β -hydroxybutyrate receptor HCA2 activates a neuroprotective subset of macrophages. *Nat Commun* 5, 3944.
- Ravin, K.A., and M. Loy. (2016) The Eosinophil in Infection. *Clinic Rev Allerg Immunol* 50, 214–227.

- Raziyeva, K., Y. Kim, Z. Zharkinbekov, K. Kassymbek, S. Jimi, and A. Saparov. (2021) Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules* 11, 700.
- Robinson, A.M., and D.H. Williamson. (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiological Reviews* 60, 143–187.
- Rodero, M.P., F. Licata, L. Poupel, P. Hamon, K. Khosrotehrani, C. Combadiere, and A. Boissonnas. (2014) In Vivo Imaging Reveals a Pioneer Wave of Monocyte Recruitment into Mouse Skin Wounds. *PLOS ONE* 9, e108212.
- Rohani, M.G., R.S. McMahan, M.V. Razumova, A.L. Hertz, M. Cieslewicz, S.H. Pun, M. Regnier, Y. Wang, T.P. Birkland, and W.C. Parks. (2015) MMP-10 Regulates Collagenolytic Activity of Alternatively Activated Resident Macrophages. *J Invest Dermatol* 135, 2377–2384.
- Rothenberg, M.E., and S.P. Hogan. (2006) The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24, 147–174.
- Saeed, S., J. Quintin, H.H.D. Kerstens, N.A. Rao, A. Aghajani-refah, F. Matarese, S.-C. Cheng, J. Ratter, K. Berentsen, M.A. van der Ent, N. Sharifi, E.M. Janssen-Megens, M.T. Huurne, A. Mandoli, T. van Schaik, A. Ng, F. Burden, K. Downes, M. Frontini, V. Kumar, E.J. Giamarellos-Bourboulis, W.H. Ouwehand, J.W.M. van der Meer, L.A.B. Joosten, C. Wijmenga, J.H.A. Martens, R.J. Xavier, C. Logie, M.G. Netea, and H.G. Stunnenberg. (2014) Epigenetic programming during monocyte to macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* 345, 1251086.
- Salter, M.W., and B. Stevens. (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23, 1018–1027.
- Sanchez, S., S. Lemmens, P. Baeten, D. Sommer, D. Dooley, S. Hendrix, and M. Gou Fabregas. (2018) HDAC3 Inhibition Promotes Alternative Activation of Macrophages but Does Not Affect Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *Exp Neurobiol* 27, 437–452.
- Satoh, T., O. Takeuchi, A. Vandenberg, K. Yasuda, Y. Tanaka, Y. Kumagai, T. Miyake, K. Matsushita, T. Okazaki, T. Saitoh, K. Honma, T. Matsuyama, K. Yui, T. Tsujimura, D.M. Standley, K. Nakanishi, K. Nakai, and S. Akira. (2010) The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 11, 936–944.
- Schagat, T.L., J.A. Wofford, and J.R. Wright. (2001) Surfactant Protein A Enhances Alveolar Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils. *The Journal of Immunology* 166, 2727–2733.
- Schleimer, R.P., A. Kato, R. Kern, D. Kuperman, and P.C. Avila. (2007) Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1279–1284.
- Scoville, S.D., A.G. Freud, and M.A. Caligiuri. (2017) Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol* 8, 360.
- Segaliny, A.I., R. Brion, E. Mortier, M. Maillason, M. Cherel, Y. Jacques, B. Le Goff, and D. Heymann. (2015) Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 1010–1021.

- Selleri, S., P. Bifsha, S. Civini, C. Pacelli, M.M. Dieng, W. Lemieux, P. Jin, R. Bazin, N. Patey, F.M. Marincola, F. Moldovan, C. Zaouter, L.-E. Trudeau, B. Benabdhalla, I. Louis, C. Beauséjour, D. Stroncek, F.L. Deist, and E. Haddad. (2016) Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming. *Oncotarget* 7, 30193–30210.
- Sengeløv, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard. (1993) Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 150, 1535–1543.
- Shakespeare, M.R., M.A. Halili, K.M. Irvine, D.P. Fairlie, and M.J. Sweet. (2011) Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends in Immunology* 32, 335–343.
- Shapouri-Moghaddam, A., S. Mohammadian, H. Vazini, M. Taghadosi, S.-A. Esmaili, F. Mardani, B. Seifi, A. Mohammadi, J.T. Afshari, and A. Sahebkar. (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology* 233, 6425–6440.
- Sharifiaghdam, M., E. Shaabani, R. Faridi-Majidi, S.C.D. Smedt, K. Braeckmans, and J.C. Fraire. (2022) Macrophages as a therapeutic target to promote diabetic wound healing. *Molecular Therapy* 30, 2891–2908.
- Shimazu, T., M.D. Hirschey, J. Newman, W. He, K. Shirakawa, N. Le Moan, C.A. Grueter, H. Lim, L.R. Saunders, R.D. Stevens, C.B. Newgard, R.V. Farese, R. de Cabo, S. Ulrich, K. Akassoglou, and E. Verdin. (2013) Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339, 211–214.
- Simpson, J.L., J. Daly, K.J. Baines, I.A. Yang, J.W. Upham, P.N. Reynolds, S. Hodge, A.L. James, P. Hugenholtz, D. Willner, and P.G. Gibson. (2016) Airway dysbiosis: *Haemophilus influenzae* and *Tropheryma* in poorly controlled asthma. *European Respiratory Journal* 47, 792–800.
- Sinha, V.C., A.L. Rinkenbaugh, M. Xu, X. Zhou, X. Zhang, S. Jeter-Jones, J. Shao, Y. Qi, J.A. Zebala, D.Y. Maeda, F. McAllister, and H. Piwnica-Worms. (2021) Single-cell evaluation reveals shifts in the tumor-immune niches that shape and maintain aggressive lesions in the breast. *Nat Commun* 12, 5024.
- Siouti, E., and E. Andreakos. (2019) The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. *Biochemical Pharmacology* 165, 152–169.
- Smolen, J.S., D. Aletaha, A. Barton, G.R. Burmester, P. Emery, G.S. Firestein, A. Kavanaugh, I.B. McInnes, D.H. Solomon, V. Strand, and K. Yamamoto. (2018) Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 4, 1–23.
- Sousa, A.B., A.P. Águas, M.A. Barbosa, and J.N. Barbosa. (2022) Immunomodulatory biomaterial-based wound dressings advance the healing of chronic wounds via regulating macrophage behavior. *Regen Biomater* 9, rbac065.

- Spits, H., D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J.P. Di Santo, G. Eberl, S. Koyasu, R.M. Locksley, A.N.J. McKenzie, R.E. Mebius, F. Powrie, and E. Vivier. (2013) Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145–149.
- Stachura, A., I. Khanna, P. Krysiak, W. Paskal, and P. Włodarski. (2022) Wound Healing Impairment in Type 2 Diabetes Model of Leptin-Deficient Mice—A Mechanistic Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 8621.
- Stubbs, B.J., P.J. Cox, R.D. Evans, P. Santer, J.J. Miller, O.K. Faull, S. Magor-Elliott, S. Hiyama, M. Stirling, and K. Clarke. (2017) On the Metabolism of Exogenous Ketones in Humans. *Frontiers in Physiology* 8, .
- Tabaie, E.A., A.J. Reddy, and H. Brahmabhatt. (2021) A narrative review on the effects of a ketogenic diet on patients with Alzheimer’s disease. *AIMS Public Health* 9, 185–193.
- Tabas, I. (2005) Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, 2255–2264.
- Taggart, A.K.P., J. Kero, X. Gan, T.-Q. Cai, K. Cheng, M. Ippolito, N. Ren, R. Kaplan, K. Wu, T.-J. Wu, L. Jin, C. Liaw, R. Chen, J. Richman, D. Connolly, S. Offermanns, S.D. Wright, and M.G. Waters. (2005) (d)- β -Hydroxybutyrate Inhibits Adipocyte Lipolysis via the Nicotinic Acid Receptor PUMA-G*. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26649–26652.
- Takayanagi, H., H. Iizuka, T. Juji, T. Nakagawa, A. Yamamoto, T. Miyazaki, Y. Koshihara, H. Oda, K. Nakamura, and S. Tanaka. (2000) Involvement of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 43, 259–269.
- Takimoto, C.H., M.P. Chao, C. Gibbs, M.A. McCamish, J. Liu, J.Y. Chen, R. Majeti, and I.L. Weissman. (2019) The Macrophage “Do not eat me” signal, CD47, is a clinically validated cancer immunotherapy target. *Ann Oncol* 30, 486–489.
- Tannahill, G.M., A.M. Curtis, J. Adamik, E.M. Palsson-McDermott, A.F. McGettrick, G. Goel, C. Frezza, N.J. Bernard, B. Kelly, N.H. Foley, L. Zheng, A. Gardet, Z. Tong, S.S. Jany, S.C. Corr, M. Haneklaus, B.E. Caffrey, K. Pierce, S. Walmsley, F.C. Beasley, E. Cummins, V. Nizet, M. Whyte, C.T. Taylor, H. Lin, S.L. Masters, E. Gottlieb, V.P. Kelly, C. Clish, P.E. Auron, R.J. Xavier, and L. a. J. O’Neill. (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 496, 238–242.
- Taylor, M.K., D.K. Sullivan, J.D. Mahnken, J.M. Burns, and R.H. Swerdlow. (2018) Feasibility and efficacy data from a ketogenic diet intervention in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 4, 28–36.
- Terranova, C.J., K.M. Stemler, P. Barrodia, S.L. Jeter-Jones, Z. Ge, M. de la Cruz Bonilla, A. Raman, C.-W. Cheng, K.L. Allton, E. Arslan, Ö.H. Yilmaz, M.C. Barton, K. Rai, and H. Piwnicka-Worms. (2021) Reprogramming of H3K9bhb at regulatory elements is a key feature of fasting in the small intestine. *Cell Reports* 37, 110044.

- Tieu, K., C. Perier, C. Caspersen, P. Teismann, D.-C. Wu, S.-D. Yan, A. Naini, M. Vila, V. Jackson-Lewis, R. Ramasamy, and S. Przedborski. (2003) D- β -Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J Clin Invest* 112, 892–901.
- Tunaru, S., J. Kero, A. Schaub, C. Wufka, A. Blaukat, K. Pfeffer, and S. Offermanns. (2003) PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. *Nat Med* 9, 352–355.
- Turvey, S.E., and D.H. Broide. (2010) Chapter 2: Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125, S24–S32.
- Udalova, I.A., A. Mantovani, and M. Feldmann. (2016) Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12, 472–485.
- Ułamek-Kozioł, M., S.J. Czuczwar, S. Januszewski, and R. Pluta. (2019) Ketogenic Diet and Epilepsy. *Nutrients* 11, 2510.
- Van den Bossche, J., A.E. Neele, M.A. Hoeksema, and M.P.J. de Winther. (2014) Macrophage polarization: the epigenetic point of view. *Current Opinion in Lipidology* 25, 367.
- Van Dyken, S.J., and R.M. Locksley. (2013) Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol* 31, 317–343.
- VanItallie, T.B., C. Nonas, A.D. Rocco, K. Boyar, K. Hyams, and S.B. Heymsfield. (2005) Treatment of Parkinson disease with diet-induced hyperketonemia: A feasibility study. *Neurology* 64, 728–730.
- Vannella, K.M., and T.A. Wynn. (2017) Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol* 79, 593–617.
- Vats, D., L. Mukundan, J.I. Odegaard, L. Zhang, K.L. Smith, C.R. Morel, D.R. Greaves, P.J. Murray, and A. Chawla. (2006) Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metabolism* 4, 13–24.
- van der Veen, T.A., L.E.S. de Groot, and B.N. Melgert. (2020) The different faces of the macrophage in asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 26, 62.
- Vidali, S., S. Aminzadeh-Gohari, R.G. Feichtinger, R. Vatrinet, A. Koller, F. Sternberg, T. Rutherford, M. O'Donnell, A. Stöger-Kleiber, B. Lambert, T.K. Felder, W. Sperl, and B. Kofler. (2017) The ketogenic diet is not feasible as a therapy in a CD-1 nu/nu mouse model of renal cell carcinoma with features of Stauffer's syndrome. *Oncotarget* 8, 57201–57215.
- Vilà-Brau, A., A.L. De Sousa-Coelho, C. Mayordomo, D. Haro, and P.F. Marrero. (2011) Human HMGCS2 Regulates Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and FGF21 Expression in HepG2 Cell Line*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 20423–20430.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503–510.

- Wang, A., S.C. Huen, H.H. Luan, S. Yu, C. Zhang, J.-D. Gallezot, C.J. Booth, and R. Medzhitov. (2016) Opposing Effects of Fasting Metabolism on Tissue Tolerance in Bacterial and Viral Inflammation. *Cell* 166, 1512-1525.e12.
- Wang, J., Y. Wang, Y. Chu, Z. Li, X. Yu, Z. Huang, J. Xu, and L. Zheng. (2021) Tumor-derived adenosine promotes macrophage proliferation in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 74, 627–637.
- Wang, L., X. Yuan, Z. Li, and F. Zhi. (2023) The Role of Macrophage Autophagy in Asthma: A Novel Therapeutic Strategy. *Mediators Inflamm* 2023, 7529685.
- Wang, Q., G. Zhu, X. Cao, J. Dong, F. Song, and Y. Niu. (2017) Blocking AGE-RAGE Signaling Improved Functional Disorders of Macrophages in Diabetic Wound. *Journal of Diabetes Research* 2017, e1428537.
- Watanabe, T., K. Asai, H. Fujimoto, H. Tanaka, H. Kanazawa, and K. Hirata. (2011) Increased levels of HMGB-1 and endogenous secretory RAGE in induced sputum from asthmatic patients. *Respiratory Medicine* 105, 519–525.
- Watts, C. (1997) Capture and Processing of Exogenous Antigens for Presentation on Mhc Molecules. *Annual Review of Immunology* 15, 821–850.
- Wculek, S.K., G. Dunphy, I. Heras-Murillo, A. Mastrangelo, and D. Sancho. (2022) Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. *Cell Mol Immunol* 19, 384–408.
- Weber, D.D., S. Aminazdeh-Gohari, and B. Kofler. (2018) Ketogenic diet in cancer therapy. *Aging (Albany NY)* 10, 164–165.
- Weber, D.D., S. Aminzadeh-Gohari, J. Tulipan, L. Catalano, R.G. Feichtinger, and B. Kofler. (2020) Ketogenic diet in the treatment of cancer – Where do we stand? *Molecular Metabolism* 33, 102–121.
- Weis, E.-M., P. Puchalska, A.B. Nelson, J. Taylor, I. Moll, S.S. Hasan, M. Dewenter, M. Hagenmüller, T. Fleming, G. Poschet, A. Hotz-Wagenblatt, J. Backs, P.A. Crawford, and A. Fischer. (2022) Ketone body oxidation increases cardiac endothelial cell proliferation. *EMBO Molecular Medicine* 14, .
- Wells, A., A. Nuschke, and C.C. Yates. (2016) Skin Tissue Repair: Matrix Microenvironmental Influences. *Matrix Biol* 49, 25–36.
- Wheless, J.W. (2008) History of the ketogenic diet. *Epilepsia* 49, 3–5.
- Wilder, R. (1921) High fat diets in epilepsy. *The Clinic Bulletin* .
- Wilgus, T.A., S. Roy, and J.C. McDaniel. (2013) Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2, 379–388.

- Wilhelm, C., J. Surendar, and F. Karagiannis. (2021) Enemy or ally? Fasting as an essential regulator of immune responses. *Trends in Immunology* 42, 389–400.
- Willenborg, S., T. Lucas, G. van Loo, J.A. Knipper, T. Krieg, I. Haase, B. Brachvogel, M. Hammerschmidt, A. Nagy, N. Ferrara, M. Pasparakis, and S.A. Eming. (2012) CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood* 120, 613–625.
- Williamson, J.R., R. Scholz, and E.T. Browning. (1969) Control Mechanisms of Gluconeogenesis and Ketogenesis: II. Interactions between fatty acid oxidation and the citric acid cycle in perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 244, 4617–4627.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. (2000) Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Laboratory Investigation* 80, 617–653.
- Włodarek, D. (2019) Role of Ketogenic Diets in Neurodegenerative Diseases (Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease). *Nutrients* 11, 169.
- Won, Y.-J., V.B. Lu, H.L. Puhl, and S.R. Ikeda. (2013) β -Hydroxybutyrate Modulates N-Type Calcium Channels in Rat Sympathetic Neurons by Acting as an Agonist for the G-Protein-Coupled Receptor FFA3. *J. Neurosci.* 33, 19314–19325.
- Wynn, T.A., and L. Barron. (2010) Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis* 30, 245–257.
- Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard. (2013) Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* 496, 445–455.
- Wynn, T.A., and T.R. Ramalingam. (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 18, 1028–1040.
- Wynn, T.A., and K.M. Vannella. (2016a) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44, 450–462.
- Wynn, T.A., and K.M. Vannella. (2016b) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 44, 450–462.
- Xie, Z., D. Zhang, D. Chung, Z. Tang, H. Huang, L. Dai, S. Qi, J. Li, G. Colak, Y. Chen, C. Xia, C. Peng, H. Ruan, M. Kirkey, D. Wang, L.M. Jensen, O.K. Kwon, S. Lee, S.D. Pletcher, M. Tan, D.B. Lombard, K.P. White, H. Zhao, J. Li, R.G. Roeder, X. Yang, and Y. Zhao. (2016) Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation. *Mol Cell* 62, 194–206.
- Xu, W., X. Zhao, M.R. Daha, and C. van Kooten. (2013) Reversible differentiation of pro- and anti-inflammatory macrophages. *Molecular Immunology* 53, 179–186.
- Xue, J., S.V. Schmidt, J. Sander, A. Draffehn, W. Krebs, I. Quester, D. De Nardo, T.D. Gohel, M. Emde, L. Schmidleithner, H. Ganesan, A. Nino-Castro, M.R. Mallmann, L. Labzin, H. Theis, M. Kraut, M.

- Beyer, E. Latz, T.C. Freeman, T. Ulas, and J.L. Schultze. (2014) Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity* 40, 274–288.
- Yan, J., and T. Horng. (2020) Lipid Metabolism in Regulation of Macrophage Functions. *Trends in Cell Biology* 30, 979–989.
- Yan, W.-L., K.-Y. Shen, C.-Y. Tien, Y.-A. Chen, and S.-J. Liu. (2017) Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 9, 347–360.
- Yancy, W.S., M. Foy, A.M. Chalecki, M.C. Vernon, and E.C. Westman. (2005) A low-carbohydrate, ketogenic diet to treat type 2 diabetes. *Nutr Metab (Lond)* 2, 1–7.
- Yang, N., N.M. Isbel, D.J. Nikolic-Paterson, Y. Li, R. Ye, R.C. Atkins, and H.Y. Lan. (1998) Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 54, 143–151.
- Yona, S., K.-W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D.A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, and S. Jung. (2013) Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.
- Youm, Y.-H., K.Y. Nguyen, R.W. Grant, E.L. Goldberg, M. Bodogai, D. Kim, D. D’Agostino, N. Planavsky, C. Lupfer, T.D. Kanneganti, S. Kang, T.L. Horvath, T.M. Fahmy, P.A. Crawford, A. Biragyn, E. Alnemri, and V.D. Dixit. (2015) Ketone body β -hydroxybutyrate blocks the NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat Med* 21, 263–269.
- Yuan, X., J. Wang, S. Yang, M. Gao, L. Cao, X. Li, D. Hong, S. Tian, and C. Sun. (2020) Effect of the ketogenic diet on glycemic control, insulin resistance, and lipid metabolism in patients with T2DM: a systematic review and meta-analysis. *Nutr. Diabetes* 10, 1–8.
- Zeisbrich, M., R.E. Yanes, H. Zhang, R. Watanabe, Y. Li, L. Brosig, J. Hong, B.B. Wallis, J.C. Giacomini, T.L. Assimes, J.J. Goronzy, and C.M. Weyand. (2018) Hypermetabolic macrophages in rheumatoid arthritis and coronary artery disease due to glycogen synthase kinase 3b inactivation. *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, 1053–1062.
- Zeng, S.G., Y.G. Ghnewa, V.P. O’Reilly, V.G. Lyons, A. Atzberger, A.E. Hogan, M.A. Exley, and D.G. Doherty. (2013) Human invariant NKT cell subsets differentially promote differentiation, antibody production and T cell stimulation by B cells in vitro. *J Immunol* 191, 1666–1676.
- Zhang, H., K. Tang, J. Ma, L. Zhou, J. Liu, L. Zeng, L. Zhu, P. Xu, J. Chen, K. Wei, X. Liang, J. Lv, J. Xie, Y. Liu, Y. Wan, and B. Huang. (2020a) Ketogenesis-generated β -hydroxybutyrate is an epigenetic regulator of CD8⁺ T-cell memory development. *Nat Cell Biol* 22, 18–25.
- Zhang, W., Q. Huang, W. Xiao, Y. Zhao, J. Pi, H. Xu, H. Zhao, J. Xu, C.E. Evans, and H. Jin. (2020b) Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRP α Axis. *Front Immunol* 11, 18.
- Zhong, R., R. Miao, J. Meng, R. Wu, Y. Zhang, and D. Zhu. (2021) Acetoacetate promotes muscle cell proliferation via the miR-133b/SRF axis through the Mek-Erk-MEF2 pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 53, 1009–1016.

- Zhou, T., X. Cheng, Y. He, Y. Xie, F. Xu, Y. Xu, and W. Huang. (2022) Function and mechanism of histone β -hydroxybutyrylation in health and disease. *Frontiers in Immunology* 13, .
- Zhu, H., D. Bi, Y. Zhang, C. Kong, J. Du, X. Wu, Q. Wei, and H. Qin. (2022) Ketogenic diet for human diseases: the underlying mechanisms and potential for clinical implementations. *Signal Transduct Target Ther* 7, 11.
- Zou, X., J. Meng, L. Li, W. Han, C. Li, R. Zhong, X. Miao, J. Cai, Y. Zhang, and D. Zhu. (2016) Acetoacetate Accelerates Muscle Regeneration and Ameliorates Muscular Dystrophy in Mice. *J Biol Chem* 291, 2181–2195.

Production scientifique

Publications

Augusto JF, Beauvillain C, Poli C, Paolini L, Tournier I, Pignon P, Blanchard S, Preisser L, Soleti R, Delépine C, **Monnier M**, Douchet I, Asfar P, Beloncle F, Guisset O, Prével R, Mercat A, Vinatier E, Goret J, Subra JF, Couez D, Wilson MR, Blanco P, Jeannin P, Delneste Y. Clusterin Neutralizes the Inflammatory and Cytotoxic Properties of Extracellular Histones. *Am J Respir Crit Care Med*. 2023 Jul 15;208(2):176-187. doi: 10.1164/rccm.202207-1253OC.

Monnier M, Paolini L, Vinatier E, Mantovani A, Delneste Y, Jeannin P. Antitumor strategies targeting macrophages: the importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages. *J Immunother Cancer*. 2022 Oct;10(10):e005560. doi: 10.1136/jitc-2022-005560.

Manuscrits soumis :

Monnier M, Preisser L, Adam C, Soleti R, Pignon P, Blanchard S, Gueguen N, Reynier P, Delépine C, Bocca C, Massiquot Q, Couez D, Morel A, Tournier I, Procaccio V, Copin MC, Beauvillain C, Delneste Y, Jeannin P. Acetoacetate confers a wound-healing phenotype to macrophages and favors skin healing.

Rocour S, Vinatier E, Fassot C, Dauvé J, Toutain A, Fronteau S, **Monnier M**, Preisser L, Croué A, Le Saux O, Morel A, Delneste Y, Martin L. T-cell-related skin inflammatory flareups with Th1 polarity in a patient with *Pseudoxanthoma elasticum*.

Communications

Communications orales :

- *Impact of the ketone body acetoacetate on the functional polarization of human macrophages.*
Journée scientifique annuelle de la SFR ICAT – Juin 2023 (Angers)
- *Impact of the ketone body acetoacetate on the functional polarization of human macrophages.*
Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie et de l'Association Française de Cytométrie – 22-24 novembre 2022 (Nice) (présentation sélectionnée sur résumé)
- *Impact du corps cétonique acétoacétate sur la polarisation fonctionnelle des macrophages humains.*
Journée scientifique de la SFR ICAT – Juin 2021 (Angers) – Prix de la meilleure communication orale

Poster :

- Journées scientifiques de l'école doctorale Biologie Santé – Avril 2023 (Nantes)
- Journée scientifique annuelle de la SFR ICAT – Juin 2022 (Angers)
- Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie et de l'Association Française de Cytométrie – Novembre 2022 (Nice)

- Journée de la recherche biomédicale Angers-Tours – Décembre 2021 (Angers) – Prix du meilleur poster
- 14èmes journées du Cancéropôle Grand Ouest - Octobre 2020 (Angers)

Formations

- Formation biostatistique « Introduction à la biostatistique » (Ecole doctorale Biologie Santé – Nantes)
- Formations continues en expérimentation animale (gestes, bonnes pratiques laboratoire, EA virtuel)
- Formation MOOC « Doctorat et poursuite de carrière » 2022 (Collège doctoral Pays de la Loire)
- Prévention et gestion des risques biologiques en laboratoire L2 (Université d'Angers)
- Formation aux gestes qui sauvent (Université d'Angers)

Autres activités

- Membre élu pour représenter les doctorants au conseil de centre du CRCI2NA depuis janvier 2022.
- Représentant des doctorants pour l'évaluation HCERES de l'école doctorale Biologie Santé Angers en 2020.
- Participation et organisation de la « Fête de la science » en 2020 et 2021 à Angers

Table des tableaux

Tableau 1. Les récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la réponse immunitaire	25
Tableau 2. Classification des sous-types de macrophages. La nature des stimuli impliqués dans la génération, les marqueurs spécifiques et les fonctions biologiques des macrophages M1 et M2 sont présentés.....	38

Table des illustrations

- Figure 1. Les principaux acteurs cellulaires de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.** Le système immunitaire est composé de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. La réponse immunitaire innée se déclenche quelques minutes/heures suivant la détection d'un signal de danger et est non spécifique d'antigène. Elle fait intervenir des barrières épithéliales, des phagocytes ainsi que des cellules présentatrices d'antigène. L'immunité adaptative se déclenche plus tardivement et génère des réponses spécifiques d'antigène, supports de la mémoire immunitaire (adapté de Abbas A.K, Lichtman A.H, Pillai S (2013), Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.)..... 13
- Figure 2. L'ontogénèse des macrophages chez la souris.** L'hématopoïèse se déroule en trois vagues. La première vague commence à E7.0 dans le sac vitellin est impliquée dans la génération de macrophages et d'érythrocytes primitifs qui donnent naissance à la microglie adulte. Lors de la deuxième vague, les progéniteurs érythro-myéloïdes (EMP) donnent naissance aux monocytes fœtaux qui donneront à leur tour des macrophages résidents. Enfin, la troisième vague commence à E10.5 avec l'émergence de la première cellule souche hématopoïétique (HSC) dans la région de l'aorte-gonade-mésonephros (AGM). Figure tirée de (Hoeffel and Ginhoux, 2018). 27
- Figure 3. Origine et développement des macrophages résidents d'origine embryonnaire et issus de l'hématopoïèse adulte.** Les macrophages adultes tissulaires peuvent avoir une origine embryonnaire et dériver des monocytes du foie fœtal et des monocytes du sac vitellin (A) ou se développer à partir des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse après avoir subi plusieurs étapes de différenciation (B). Les monocytes migrent ensuite dans les tissus et se différencient en macrophages spécifiques aux tissus (C). 28
- Figure 4. Représentation schématique des principales propriétés et fonctions des macrophages.** Les macrophages jouent un rôle central dans l'immunité en phagocytant les microbes et les cellules mortes, en présentant les antigènes aux cellules immunitaires adaptatives et en régulant de nombreux processus cellulaires via la production de nombreux médiateurs solubles. Cette diversité de propriétés explique leur contribution dans de nombreux processus physiologiques (inflammation, défense antimicrobienne et antitumorale, réparation tissulaire). 30
- Figure 5. Différentes propriétés et localisation des sous-populations de macrophages tissulaires.** Figure issue de (Murray and Wynn, 2011). 33
- Figure 6. Représentation schématique de la classification des macrophages.** A. Représentation monochromatique de la classification des macrophages sur la base de la dichotomie Th1/Th2 reposant sur une échelle linéaire ayant pour extrémités les macrophages M1 et M2. B. Roue chromatique représentant les trois populations de macrophages décrites par Mosser et Edwards, classées selon les trois couleurs primaires : le rouge désignant les macrophages activés classiquement, le bleu

représentant les macrophages régulateurs et le jaune représentant les macrophages réparateurs. Figure adaptée de (Mosser and Edwards, 2008a)..... 36

Figure 7. Les modifications épigénétiques régulant la polarisation des macrophages. Figure adaptée de (Davis and Gallagher, 2019). 41

Figure 8. Différences dans la génération et la polarisation des macrophages humains et murins. A. Panel de gauche, les macrophages humains sont généralement générés in vitro à partir de monocytes du sang périphérique cultivés en présence de facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) (en présence ou en absence d'IFN γ) ou de facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF) / IL-34 (en présence ou en absence d'IL-4) pour générer des cellules M1 et M2, respectivement. Pour révéler leur phénotype, les macrophages humains doivent être activés. Panel de droite : Les macrophages murins sont principalement générés à partir de progéniteurs de cellules myéloïdes de la moelle osseuse maintenus dans le M-CSF. L'utilisation du GM-CSF permet de générer à la fois des cellules dendritiques et des macrophages. B. Panel de gauche : les marqueurs humains de la polarisation des macrophages sont représentés. Panel de droite : marqueurs murins de la polarisation des macrophages. BMDC, bone-marrow derived dendritic cells; BMDM, bone-marrow derived macrophages; GM-CSF, Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; HIF-1 α , hypoxia inducible factor; IFN- γ , Interferon-gamma; IRF, Interferon regulatory factor; LPS, lipopolysaccharide; M-CSF, Macrophage colony-stimulating factor MHC-II, major histocompatibility complex class II; STAT, Signal transducer and activator of transcription. Figure tirée de (Monnier et al., 2022)..... 44

Figure 9. Rôles protumoraux des macrophages associés aux tumeurs (TAM). Les TAM sécrètent des facteurs dans le microenvironnement tumoral et expriment des molécules qui favorisent la tumorigenèse en favorisant la prolifération des cellules tumorales, l'angiogenèse/lymphoangiogenèse, les métastases et l'immunosuppression. Les TAMs peuvent également favoriser l'immunosuppression en induisant des cellules Treg, inactivant les cellules cytotoxiques et inhibant la maturation des cellules dendritiques (DC). EGF, epithelial growth factor; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MMP, matrix metalloprotease; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. Figure tirée de (Monnier et al., 2022)..... 46

Figure 10. Étapes du processus de réparation tissulaire et implication des macrophages dans la cicatrisation. Les macrophages résidents éliminent les débris cellulaires et contribuent à l'initiation de la réponse inflammatoire qui permet le recrutement des neutrophiles et monocytes. Les monocytes se différencient en macrophages pro-inflammatoires. Durant la phase de prolifération cellulaire, les macrophages pro-inflammatoires switch vers un profil anti-inflammatoire. Ils produisent des cytokines anti-inflammatoires et des facteurs de croissance impliqués dans la résolution de l'inflammation, l'angiogenèse, la différenciation des fibroblastes et la synthèse de collagène. Pendant le remodelage

tissulaire, les macrophages contribuent au remodelage de la matrice extracellulaire en sécrétant des métalloprotéases matricielles. VEGF, vascular endothelial growth factor; IL, interleukin; MMP, matrix metalloprotease; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- β , transforming growth factor- β 51

Figure 11. Polarisation des macrophages lors de la cicatrisation. CCL, C-C motif chemokine ligand; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; HB-EGF, Heparin-binding EGF; IFN, interferon; IGF, insulin-like growth factor; IL, interleukin; MMP, matrix metalloprotease; OSM, Oncostatin M; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF, transforming growth factor; TNF, Tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. Inspirée de (Sousa et al., 2022)..... 53

Figure 12. Synthèse et métabolisation des corps cétoniques. Représentation schématique de la production de corps cétoniques par les hépatocytes (A) et leur métabolisation dans les tissus extra-hépatiques (B). mThiolase, thiolase mitochondriale ; ETC, chaîne de transport d'électron ; CS, citrate synthase. Figure adaptée de (Puchalska and Crawford, 2017a; Matsuura et al., 2023)..... 58

Figure 13. Voies de signalisation des corps cétoniques. L'AcAc et le β -OHB exercent différentes modifications/rôles cellulaires médiées par des modifications épigénétiques, post traductionnelles et récepteurs cellulaires. bhb, lysine β -hydroxybutyrylation ; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FFA, free fatty acid; FGF, fibroblast growth factor; GPR, G-protein coupled receptor; HDAC, histone deacetylase ; HSL, lipase hormono-sensible ; LPL, Lipoprotéine lipase ; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MCT, monocarboxylate transporter; MEK, MAPK/ERK kinase ; PLC β , phospholipase C- β ; SIRT, sirtuin; SNS, sympathetic nervous system; TAG, triacylglycerol; TNF, tumor necrosis factor. Figure tirée de (Puchalska and Crawford, 2021). 59

RÉSUMÉ

Les macrophages sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Ils présentent donc une grande diversité de fonction, associée à une multitude de phénotypes. L'acquisition du phénotype est dictée par la nature et la quantité de signaux présents, localement, dans le tissu dans lequel ils résident. De plus, le phénotype des macrophages s'adapte aux modifications de son environnement. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont souligné le rôle des métabolites dans la polarisation des macrophages. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact du corps cétonique acétoacétate (AcAc) sur la polarisation fonctionnelle des macrophages humains.

Les résultats montrent que l'AcAc induit *in vitro* des macrophages présentant un phénotype réparateur, avec notamment l'acquisition, de manière séquentielle, de l'expression de gènes impliqués dans le processus de réparation tissulaire. Ce processus est médié par des modifications épigénétiques impliquant la méthylation de l'histone H3K27. Enfin, nous avons observé qu'un régime cétogène accélère la fermeture des plaies dans un modèle murin de cicatrisation de plaie cutanée et que cette réponse est associée à la présence, dans la peau, de macrophages présentant un phénotype réparateur.

En conclusion, cette étude identifie l'AcAc comme un métabolite unique capable de favoriser la génération de macrophages présentant un phénotype réparateur et montre qu'un régime cétogène accélère le processus de cicatrisation *in vivo*.

mots-clés : macrophages, polarisation, acétoacétate, diète cétogène, réparation tissulaire

ABSTRACT

Macrophages are involved in many physiological processes. They therefore exhibit a large diversity of functions associated with a multitude of phenotypes. The acquisition of the phenotype is dictated by the nature and the quantity of signals present, locally, in the tissue in which they reside. Recent studies have underlined the pivotal role played by metabolites in the polarization of macrophages. In this study, we evaluated the impact of the ketone body acetoacetate (AcAc) on the polarization of human macrophages.

Results show that AcAc induces macrophages with a wound-healing phenotype, characterized the time-dependent expression of a set of genes involved in tissue repair. This process is mediated by epigenetic modifications involving histone H3K27 methylation. Finally, we observed that a ketogenic diet accelerates wound closure in a murine model of cutaneous wound-healing, and that this process is associated with the presence, in the skin, of macrophages with a tissue repair phenotype.

In conclusion, this study identifies AcAc as a unique metabolite capable of promoting the generation of macrophages with a wound healing phenotype and shows that a ketogenic diet accelerates the wound-healing process *in vivo*.

keywords : macrophages, polarization, acetoacetate, ketogenic diet, wound healing



Annexes

Antitumor strategies targeting macrophages: the importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages

Monnier et al., revue publiée dans le journal J Immother Cancer

Antitumor strategies targeting macrophages: the importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages

Marine Monnier,^{1,2} Léa Paolini,^{1,2} Emeline Vinatier,^{1,2,3} Alberto Mantovani ,^{4,5,6} Yves Delneste,^{1,2,3} Pascale Jeannin^{1,2,3}

To cite: Monnier M, Paolini L, Vinatier E, *et al.* Antitumor strategies targeting macrophages: the importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;**10**:e005560. doi:10.1136/jitc-2022-005560

MM and LP contributed equally.

MM and LP are joint first authors.

Accepted 09 August 2022



© Author(s) (or their employer(s)) 2022. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

¹Univ Angers, Nantes Université, Inserm, CNRS, CRCI2NA, LabEx IGO, Angers, France

²Univ Angers, SFR ICAT, Angers, France

³Immunology and Allergology laboratory, University Hospital of Angers, Angers, France

⁴Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Milan, Italy

⁵IRCCS Humanitas, Research Hospital, Milan, Italy

⁶William Harvey Research Institute, Queen Mary University, London, UK

Correspondence to

Pr Pascale Jeannin;
pascale.jeannin@univ-angers.fr

ABSTRACT

Macrophages are the immune cells that accumulate the most in the majority of established tumors and this accumulation is associated with a poor prognosis. Tumor-associated macrophages (TAMs) produce inflammatory cytokines and growth factors that promote tumor expansion and metastasis. TAMs have recently emerged as targets of choice to restore an efficient antitumor response and to limit tumor growth. Many molecules targeting TAMs are actually evaluated in clinical trials, alone or in combination. While these molecules induce tumor regression and stimulate cytotoxic responses in mouse models of tumor development, results from early clinical trials are less impressive. In this review, we list the biological differences between human and mouse macrophages that help explain the different efficacy of antitumor strategies targeting TAMs between human and animal studies. Differences in the impact of survival and polarization factors and in the cytokines produced and markers expressed as well as the limitations of extrapolations based on in vitro models of TAM-like generation should be considered in order to improve the design and efficacy of antitumor drugs targeting TAMs.

INTRODUCTION

Macrophages, which are the most abundant infiltrating immune cells in the majority of solid tumors, facilitate tumor growth and metastasis. Indeed, tumor-associated macrophages (TAMs) participate in most of the mechanisms involved in tumor growth, namely cell proliferation, angiogenesis, metastasis, immune suppression and smoldering inflammation. TAMs have thus emerged as targets and different strategies, such as functional reprogramming or inhibition of their recruitment, gave encouraging results in several preclinical models of tumor development. Nevertheless, the results in humans may be less impressive.^{1,2} Considering

the biological differences between human and mouse macrophages and the limits of the models and markers used to assess their functions should improve the design and effectiveness of antitumor strategies based on targeting/manipulating TAMs. In this review, we highlight the differences between human and murine TAMs (summarized in [table 1](#)) that need to be considered in the design of clinical trials.

MACROPHAGES, A HETEROGENEOUS AND MULTIFUNCTIONAL CELL POPULATION

Macrophages are myeloid cells of the innate immune system, present in almost all tissues. They perform diverse and essential functions. In addition to their antimicrobial activity, they ensure the maintenance of tissue homeostasis and control all phases of healing and tissue repair. They are also involved in the initiation and resolution of the inflammation and can present antigens to memory (but not naive) T cells.³

Resident macrophages exhibit highly specialized functions (eg, Kupffer cells in the liver or microglia in the central nervous system). Monocytes can also be recruited to inflamed or injured tissues, where they undergo local differentiation into macrophages. This process is a critical step in their functional polarization, as the phenotype they acquire is driven by the nature of the differentiation signals present in their environment. Moreover, macrophages are plastic, meaning that they continuously adapt their phenotype to the demands of the tissue, as they permanently screen their environment.^{4,5} A multitude of factors/signals, such as microbes, cytokines, changes in nutrients or metabolite

Table 1 Differences between mouse and human macrophages that may impact the efficacy of antitumor strategies targeting TAM

Parameters	Murine M ϕ	Human M ϕ	Tumor microenvironment and human TAMs	Therapeutic implications
Roles of GM-CSF	Induces DCs and M ϕ generation	Induces M ϕ generation	Present in inflammatory and tumor sites Modulates the phenotype of human TAMs	M-CSF neutralization may boost the impact of GM-CSF and thereby favor DC generation in mice but not in human
Type II IFN expression	High expression	Low expression by both in vitro generated human M ϕ and TAMs		Type II IFN production by murine TAMs may favor cytotoxic T lymphocyte responses and their reprogramming into antitumor M ϕ
M1/M1-type versus M2/M2-type polarizing factors	M1: IFN γ +LPS M2: M-CSF+IL-4	M1-type: GM-CSF, GM-CSF+IFN γ M-CSF+IFN γ M2-type: M-CSF+IL-4 (or IL-1 or IL-10)	Cancers are mostly infiltrated by Th1, Th17 and Treg cells rather than Th2 cells The M1/M2 classification (based on the Th1/Th2 dichotomy) and IL-4-induced M2-like cells as a model of TAMs are poorly relevant in human cancer	The M1/M2 model is not relevant for human TAM characterization
M1/M1-type and M2/M2-type markers	M1: iNOS, CD80, MHC-II, IFN γ M2: Arg1, Ym1, VEGF ...	M1-type: inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF α), IL-12 M2-type: growth factors (TGF- β , VEGF, EGF, PDGF), IL-10	Human TAMs exhibit both M1 and M2 characteristics (concomitant expression of inflammatory and regulatory cytokines and of growth factors)	Prototypic mouse M1 and M2 markers cannot be used to characterize human TAMs
Polarization versus activation	Resting (M2) and LPS-stimulated (M1) cells are usually compared	Human M ϕ and TAMs require to be stimulated (such as via CD40 or TLRs) to reveal their phenotypes		Human M ϕ polarization and activation are two independent processes
	Arg1, arginase 1; DCs, dendritic cells; EGF, epithelial growth factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharide; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MHC-II, major histocompatibility complex class II; M ϕ , macrophage; PDGF, platelet-derived growth factor; PRR, pattern recognition receptors; TAMs, tumor-associated macrophages; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.			

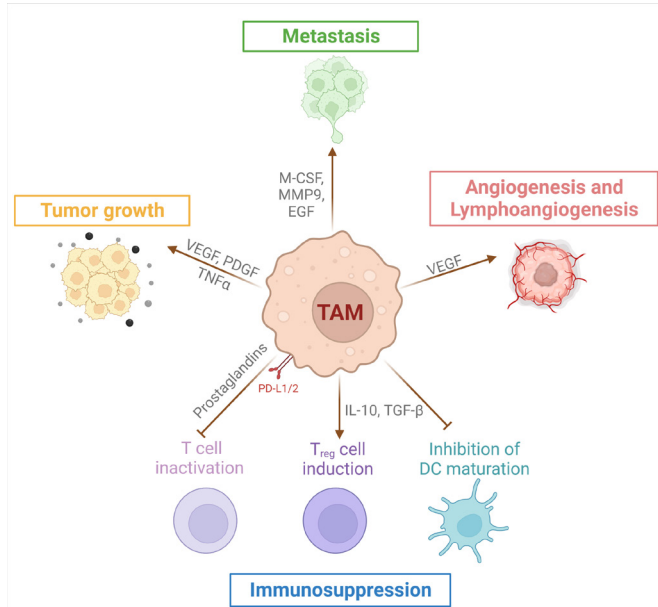


Figure 1 Protumor roles of tumor-associated macrophages (TAMs). TAMs secrete factors into the tumor microenvironment and express membrane molecules that promote tumorigenesis by favoring tumor cell proliferation, angiogenesis/lymphoangiogenesis, metastasis and immunosuppression. TAMs mediate immunosuppression through induction of regulatory T cells (Treg), inactivation of effector T cell function and inhibition of dendritic cell (DC) maturation. EGF, epithelial growth factor; IL, interleukin; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MMP, matrix metalloprotease; PDGF, platelet-derived growth factor; TGF- β , transforming growth factor- β ; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

concentrations, extracellular pH, oxygen tension and pressure alteration, induces metabolic and epigenetic modifications that are associated with their functional adaptation. Depending on the factors they encounter, macrophages can thus adopt a multiplicity of phenotypes, which makes it difficult to classify them according to their phenotype.⁶ However, and although incomplete and simplifying, the classification of proinflammatory M1 versus reparative M2 macrophages remains widely used.

As detailed later in this review, the M1/M2 classification was originally defined by *in vitro* generated murine macrophage subsets and is based on well characterized phenotypic signatures. However, such signatures are rarely, if ever, observed in human macrophages. In order to circumvent this limitation, and despite being simplistic, a classification of human macrophages into M1-like and M2-like subtypes has been proposed. In this review, we will use these terms as a functional classification (anti-tumor M1-like vs protumor M2-like cells).

TAMS: A COMPLEX DIVERSITY

In the majority of established tumors, macrophages accumulate in larger numbers than the other immune cells^{7–10} and their accumulation is associated, in most cancers,

with a poor prognosis.^{7 11 12} TAMs favor tumor growth and metastasis, angiogenesis and lymphoangiogenesis and tumor-associated inflammation, and decrease effector CD8⁺ T-cell recruitment and function^{13–16} (figure 1).

TAMs derive from both resident tissue macrophages and newly recruited monocytes.^{17 18} In a mouse model of lung cancer, lineage tracing experiments revealed that TAMs are initially composed of resident macrophages that acquire protumor functions and proliferate, and that, in later phases of tumor development, TAMs are predominantly composed of recruited monocytes that have differentiated locally.¹⁸ While the proliferation of murine macrophages has been widely reported,^{19–21} that of human macrophages remains poorly documented.^{22–24} In humans, the importance of monocyte recruitment in maintaining pools of TAMs was recently demonstrated in patients with cancer after bone marrow transplantation.²⁵ Moreover, it appears obvious that the density of TAMs in a fast-growing tissue may probably result from the recruitment of monocytes rather than a massive expansion of resident macrophages whose proliferative capacity remains questionable in humans.

Many molecules targeting TAMs are currently in clinical trials, either alone or in combination with chemotherapy, radiotherapy or immunotherapy (especially immune checkpoint inhibitors (ICI)).^{26–29} TAM-targeting approaches, described in recent reviews, are of two types: those preventing TAM accumulation and/or survival (eg, by inhibiting the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)/CD115 or C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)/CCR2 axis)^{30 31} and those making use of the phagocytic properties of TAMs (eg, blocking the SIRP1 α /CD47 interaction) or of their cytotoxic activity.^{30–33} These strategies decrease tumor growth and stimulate cytotoxic CD8⁺ T-cell responses in combination with chemotherapy, radiotherapy, or ICI in different mouse models of tumor development. Based on these results, clinical trials aiming to evaluate the impact of strategies targeting TAMs are currently underway. Here, we provide an overview of some of the key observations that need to be considered when extrapolating results obtained in mouse models to humans.

Differences in the processes of generation and functional polarization of mouse and human macrophages

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induces the generation of dendritic cells in mice and macrophages in humans

As discussed earlier, the accumulation of TAMs in established tumors results principally from monocyte recruitment induced by attracting molecules, including mainly M-CSF (CSF-1) and CCL2 (also known as MCP-1). This process can be also induced by other chemokines, such as C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) and CXCR5 ligands.^{13–15} A number of clinical trials are assessing neutralization of CD115 (or c-fms), the receptor for M-CSF and interleukin (IL)-34, as a means of preventing TAM accumulation. In mouse models, neutralization

of the M-CSF–IL-34/CD115 axis acts in synergy with chemotherapy and ICI to reduce tumor growth and to favor CD8⁺ T-cell responses.^{26–34} However, clinical trials in humans have given disappointing results^{1–35} and some TAM subsets seem resistant to this approach.²² It also seems likely that in vivo neutralization of the M-CSF–IL-34/CD115 axis amplifies the impact of GM-CSF (also known as CSF-2) on myeloid cells.³⁶

Importantly, GM-CSF has different effects on myeloid cell differentiation in human and mice.³⁷ M-CSF is constitutively expressed in many tissues, whereas GM-CSF is present principally at sites of inflammation, including tumor sites, as it is produced by activated immune and non-immune cells and by some tumors.^{37–39} GM-CSF triggers the differentiation of murine myeloid precursors into mature dendritic cells,^{40–41} and favors antitumor responses by facilitating dendritic cell recruitment and

activation.^{37–42} For example, in a murine melanoma model, vaccination with irradiated melanoma cells engineered to secrete GM-CSF stimulates robust and long-lasting anti-tumor immunity.^{43–44} Conversely, GM-CSF neutralization affects murine dendritic cell recruitment in vivo.⁴⁵ Based on these observations, GM-CSF has been used in dendritic cell-based tumor vaccine trials as an inducer of dendritic cell maturation, and is currently included in antitumor immunotherapies.⁴² However, in humans, both M-CSF and GM-CSF promote monocyte survival and differentiation into macrophages (figure 2A, left panel). M-CSF triggers in vitro the generation of regulatory macrophages that maintain tissue homeostasis, whereas GM-CSF induces the generation of macrophages that produce inflammatory cytokines (including IL-6, IL-1 β and tumor necrosis factor α) on stimulation (figure 2B), the production of these mediators being upregulated by interferon

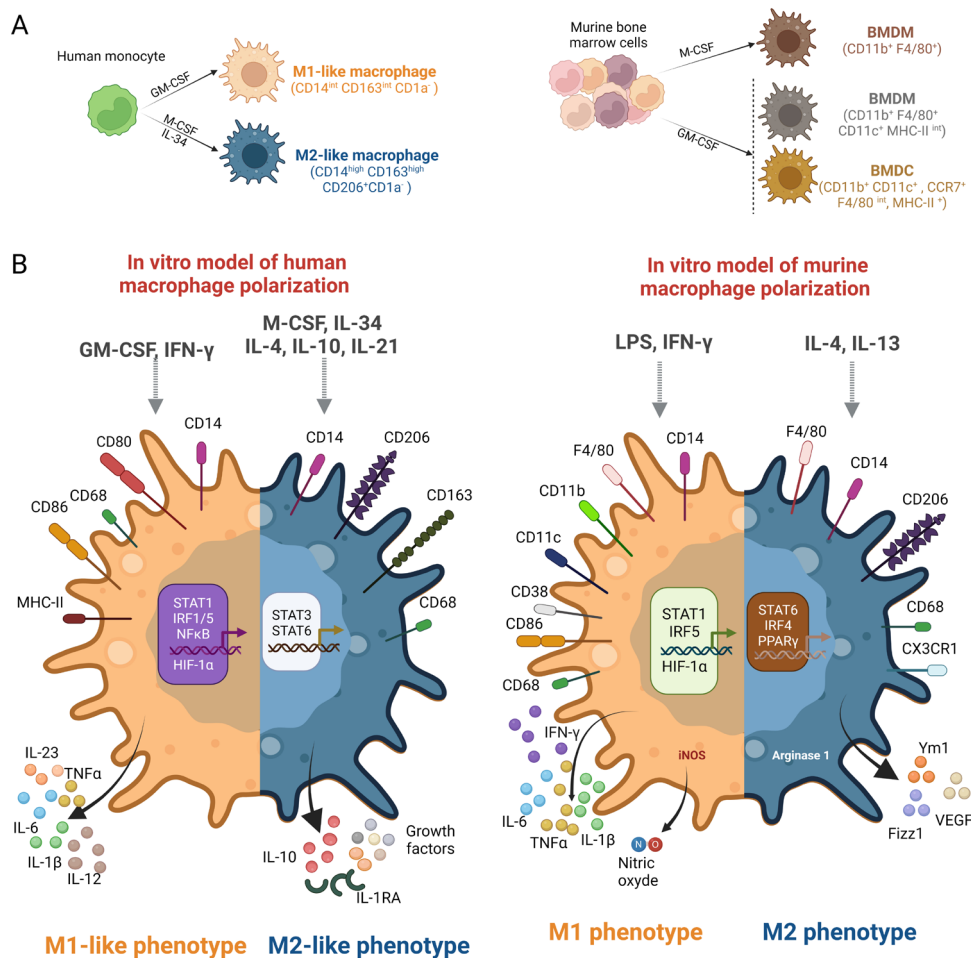


Figure 2 Differences in the generation and polarization of human and murine macrophages. (A) Left panel, human macrophages are usually generated in vitro from peripheral blood monocytes cultured in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (in the presence or absence of IFN γ) or macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)/interleukin (IL)-34 (in the presence or absence of IL-4) to generate M1 and M2 cells, respectively. To reveal their phenotype, human macrophages must be activated. Right panel: Murine macrophages are primarily generated from bone marrow myeloid cell progenitors maintained in M-CSF. The use of GM-CSF leads to the generation of both dendritic cells and macrophages.⁸⁷ (B) Left panel, human markers of macrophage polarization are shown. Right panel: murine markers of macrophage polarization. BMDC, bone-marrow derived dendritic cells; BMDM, bone-marrow derived macrophages; HIF-1 α , hypoxia inducible factor; IFN γ , Interferon-gamma; IRF, Interferon regulatory factor; LPS, lipopolysaccharide; MHC-II, major histocompatibility complex class II; STAT, Signal transducer and activator of transcription.

gamma (IFN γ).^{37 38 46 47} Moreover, high concentrations of GM-CSF promote the recruitment of immunosuppressive murine myeloid cells within tumors.^{39 48} This, and the opposite effects of GM-CSF on the differentiation of human and murine myeloid precursors into macrophages and dendritic cells, respectively, may provide some explanation for the poor efficacy of GM-CSF as an adjuvant for antitumor vaccines in humans.⁴²

Importantly, a recent study reported, in a mouse model of breast-to-brain metastasis, that the inhibition of CD115 induced a compensatory increase of GM-CSF synthesis by pericytes that induced the acquisition by TAM of an inflammatory and tissue repair profile.⁴⁹ One can thus suspect that, *in vivo*, the neutralization of the M-CSF–IL-34/CD115 axis may exacerbate the role of GM-CSF, which would then promote the generation, in humans, of inflammatory macrophages favoring tumor recurrence.

Moreover, we have recently shown that the simultaneous presence of GM-CSF and lactic acid, a metabolite that accumulates in glycolytic tumors, induces the generation of macrophages producing inflammatory cytokines and tumor-promoting factors that display similarities to the ovarian cancer TAMs.⁵⁰ Another study also reported that lactic acid increases the expression of VEGF by murine macrophages.⁵¹ These results suggest that some features of TAMs are induced independently of M-CSF, a prototypic M2 inducer, contributing to explain the lack of sensitivity to CD115 blockade of some TAM subsets, such as angiogenic TAMs.⁵²

It could be argued that, in the presence of IL-4 and/or IL-13, GM-CSF induces the differentiation of human monocytes into dendritic cells.⁵³ While lactic acid is frequently found in cancers, the expression of IL-4 or IL-13 has only been reported in a restricted number of cancers, and mouse, but not human myeloid cells, express IL-4 and IL-13, excluding an autocrine role in the generation of human TAMs. Collectively, these results suggest that the role of IL-4 and IL-13 in the functional polarization of human TAM should be limited.⁵⁴

It should be noted that other strategies aiming to reduce macrophage accumulation by neutralizing the CCL2/CCR2, CXCL12 (or SDF1)/CXCR4 or IL-1/IL-1 receptor axes, together with strategies reducing the recruitment of neutrophil precursors, which exhibit suppressive properties (eg, by targeting the C5a receptor, by jointly neutralizing CCR2 and CCR5, or by using a CD11b agonist), are also currently evaluated in clinical trials.^{55 56}

Given the difference in factors controlling dendritic cell and macrophage generation between humans and mice, the impact of these strategies on the recruitment and differentiation of precursors and/or activation of human macrophages (as well as of dendritic cells) should systematically be evaluated.

Polarization and activation of human macrophages should be distinguished as two independent processes

Macrophages express different phenotypes, depending on the signals present in the environment. *In vitro*

experiments with human monocytes have shown that this process, referred to as polarization, is time dependent.⁵⁷ Moreover, human macrophages require stimulation (via CD40 or using TLR agonists) to reveal their cytokine profile (except those constitutively produced, such as CCL2).^{46 50} For murine M1 and M2 cells, the terms polarization and activation are not dissociated, and resting and activated cells are compared in studies using murine cells.

Myeloid cell activators, including TLR agonists, are currently evaluated in clinical trials as inducers of TAM reprogramming into antitumor cells.^{26 30} Importantly, TLR9 is expressed by murine but not human myeloid cells, a fundamental difference that may profoundly impact the consequences of TLR9 agonists on macrophage polarization.

TLRs and CD40 agonists induce dendritic cell maturation and facilitate the generation of a protective antitumor response. In contrast, the activation of TAM is likely to enhance the production of immunosuppressive cytokines and growth factors, thus strengthening their protumor phenotype. Thus, acting on both polarization and activation may be required to reprogram human TAMs into antitumor cells. Repolarization could be achieved by modulating the metabolic and/or cytokine microenvironment. Consistent with the view of tumors as a wound that never heals,⁵⁸ we and others have shown that factors classically associated with tissue lesions, such as lactic acid, contribute to the phenotype of TAMs.^{50 51} Various molecules affecting tumor cell metabolism (by inhibiting glycolysis or other metabolic pathways) are currently in clinical trials^{59 60}; the impact of these molecules, used alone or, preferentially, in combination with other TAM-targeting molecules, should also be studied on human TAMs. Combination treatments that repolarize TAMs and activate TAMs and dendritic cells should be beneficial.

Phenotypic differences between human and mouse macrophages/TAMs

Mouse and human macrophages differ in their capacity to produce IFN γ

IFN γ , which has an important role in immune surveillance, facilitates the generation and activation of Th1 lymphocytes and the initiation of cytotoxic T lymphocyte responses. IFN γ is also a potent activator of myeloid cells: it polarizes dendritic cells into IL-12-producing cells (known as DC1), thereby facilitating the generation of Th1 lymphocytes. Previously known as macrophage activating factor, IFN γ induces the generation of inflammatory macrophages that are potentially cytotoxic to tumor cells. IFN γ may also have protumor effects through a feedback effect. For example, IFN γ helps to maintain peripheral tolerance by increasing PD-L1 expression by tumor cells.

Due to its potent antitumor activity, IFN γ has been used in the treatment of certain cancers and is currently being tested, in association with other antitumor molecules, in clinical trials.⁶¹ It is currently thought that the

dose and duration of IFN γ treatment need to be established, to optimize its beneficial effect when combined with antitumor therapies.⁶¹ Nevertheless, while murine macrophages are IFN γ -producing cells (figure 2B, right panel), human myeloid cells produce IFN γ at a very low level compared with lymphoid cells^{62,63} and, importantly, the combination IL-12 plus IL-18 appears as the most effective in inducing IFN γ production by human macrophages. Of note, IL-12, a prototypic antitumor cytokine,⁶⁴ is poorly expressed in most tumors and IL-18 exhibits protumor activity (favoring cancer progression, metastasis, angiogenesis and immune suppression).⁶⁵ This will make unlikely an in situ reprogramming of human TAM into antitumor cells in the absence of IFN γ -producing lymphoid cells. Moreover, the activation/reprogramming by IFN γ may lower the efficacy of anti-PD-1/-PD-L1 antibody treatment (consecutive to an upregulation of PD-L1 expression by tumor cells), in contrast to the beneficial impact of combining TAM activation (that induces IFN γ production) and PD1 targeting in murine models of tumor development.⁶⁶

The M1/M2 model does not reflect the phenotypic diversity of TAMs

Murine TAMs are commonly characterized by transcriptome analysis, thanks to the specific expression of genes defined as 'M2/protumor' and 'M1/antitumor' cells, according to the M1/M2 classification which distinguishes macrophages differentiated in the presence of M-CSF with either IL-4 (M2) or IFN γ plus LPS (M1) (figure 2A, right panel).⁶⁷

Although IL-4 and IL-13 expressions have been detected in some cancers,^{68–70} the use of macrophages generated in the presence of IL-4 as a model for protumor macrophages is of little physiological relevance, as discussed earlier. The M1/M2 classification was based on the Th1/Th2 dichotomy, itself derived from an analysis of the physiological mechanisms associated with autoimmune diseases in mice of different genetic backgrounds. The pathophysiology of autoimmune diseases is now characterized by a Th1–Th17/Treg imbalance rather than a Th1/Th2 imbalance. Similarly, cancer development is associated with a sustained inflammation and profound immune suppression involving Th1, Th17 and Treg cells, rather than Th2 accumulation. Moreover, although the expression of IL-4 and IL-13 has been detected in some cancers, M2 cells generated in the presence of IL-4 are considered as prototypic tissue repair macrophages rather than bona fide protumor macrophages.

Macrophages play an essential role in controlling all stages of the tissue repair process,³ but the expression of IL-4 or IL-13 is not a characteristic of healing areas, and other factors present locally in the injured areas, such as IL-21, IL-25 and IL-33,⁷¹ may also confer a wound healing phenotype to macrophages.^{72–74} Thus, the study of genes associated with M2 cells generated in the presence of IL-4 are of more relevance in mouse models of

allergic reactions or helminth infections than in cancers or wound-healing process.

Most of the prototypic murine M1 and M2 markers are not suitable for the characterization of human macrophages

The phenotypes of macrophage subsets drastically differ between human and mouse (figure 2B). Human M1-like macrophages are characterized by an elevated expression of membrane CD80 and CD86 and by the secretion of inflammatory cytokines and IL-12. In contrast, murine M1 macrophages express CD11c, CD11b and CD38 and produce nitric oxide in addition to proinflammatory cytokines. Human M2-like macrophages are characterized by an elevated expression of CD163 and CD206 and by the production of IL-10 and of several growth factors when murine M2 macrophages are defined as arginase 1 (Arg1)-expressing and VEGF-expressing cells. Moreover, the genes overexpressed in the presence of IL-4 or IFN γ greatly differ between human and mouse macrophages.^{67,73,75} Either there are no human homologs of particular genes (eg, *Ym1* and *Fizz1*) or their expression is differentially regulated. The most widely used signature is the expression of inducible nitric oxide synthase by murine M1 cells and of Arg1 by murine M2 cells, two molecules not expressed by human macrophages.^{67,76}

More generally, there is little correspondence between the genes upregulated by IL-4 in human and mouse macrophages.⁶¹ In addition, most of the genes used to characterize murine M1 and M2 cells have no known function, making it difficult to extrapolate their protumor versus antitumor functions. Reinforcing this result, Zilionis *et al* nicely demonstrated that, in lung tumors, TAMs exhibit species-specific profiles,⁷⁷ emphasizing the importance of characterizing human macrophages instead of extrapolating from mouse phenotypes. Finally, the transcription factors involved in the polarization of M1-like and M2-like macrophages differ between human and mouse (figure 2B).

The most informative and reliable way to characterize the function of human macrophages is based on the profiling of soluble mediators, including growth factors, inflammatory cytokines and immunosuppressive molecules. This approach is all the more relevant as cumulative single-cell analysis studies in different tumors revealed/confirmed that human TAM exhibit mixed M1-like and M2-like signatures.^{50,78–82} Surface markers on human macrophages display lower levels of modulation than cytokine production, and, when modulated (eg, CD163, which reflects M-CSF consumption; CD206, which reflects IL-4 consumption), their expression is not predictive of their protumor or antitumor functions.

Concluding remarks

In conclusion, the different impacts of GM-CSF on human versus murine myeloid cell differentiation, the absence of IFN γ and TLR9 expression by human macrophages and the limits of models using IL-4 as an inducer of repair macrophages are all features that distinguish human

macrophages from mouse macrophages and that must be considered when translating from the preclinical to the clinical therapeutic application.

All these information have to be taken account to optimize strategies that directly target TAM, especially with the emergence of promising new antitumor therapies that promote the phagocytic activity of macrophages by targeting the CD47/SIRP α axis, as recently reported for B-cell lymphoma and some solid tumors.^{83–86}

Correction notice This article has been corrected. The affiliations of Alberto Mantovani have been updated.

Contributors PJ conceived and supervised this study. MM and LP drafted the manuscript and the figures. AM and YD provided critical revision of the manuscript. All authors read and approved the submitted version.

Funding This study did not receive specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. This work was realized in the context of (i) the LabEx ImmunoGraftOnco program (National Research Agency; ANR-11-LABX-0016-01) and (ii) the University Hospital of Angers - University of Angers joint program (project 3I-Impact).

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not applicable.

Ethics approval Not applicable.

Provenance and peer review Commissioned; externally peer reviewed.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

ORCID iD

Alberto Mantovani <http://orcid.org/0000-0001-5578-236X>

REFERENCES

- Gomez-Roca CA, Italiano A, Le Tourneau C, *et al.* Phase I study of emactuzumab single agent or in combination with paclitaxel in patients with advanced/metastatic solid tumors reveals depletion of immunosuppressive M2-like macrophages. *Ann Oncol* 2019;30:1381–92.
- Noel M, O'Reilly EM, Wolpin BM, *et al.* Phase 1B study of a small molecule antagonist of human chemokine (C-C motif) receptor 2 (PF-04136309) in combination with nab-paclitaxel/gemcitabine in first-line treatment of metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Invest New Drugs* 2020;38:800–11.
- Lucas T, Waisman A, Ranjan R, *et al.* Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 2010;184:3964–77.
- Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* 2016;17:9–17.
- Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol* 2020;15:123–47.
- Xue J, Schmidt SV, Sander J, *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014;40:274–88.
- Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 2015;21:938–45.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787–95.
- Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, *et al.* Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 2013;39:782–95.
- Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, *et al.* The immune landscape of cancer. *Immunity* 2019;51:411–2.
- Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:887–904.
- Sinha VC, Rinkenbaugh AL, Xu M, *et al.* Single-cell evaluation reveals shifts in the tumor-immune niches that shape and maintain aggressive lesions in the breast. *Nat Commun* 2021;12:5024.
- Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, *et al.* Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:399–416.
- Allavena P, Sica A, Garlanda C, *et al.* The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 2008;222:155–61.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002;23:549–55.
- Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014;41:49–61.
- Loyher P-L, Hamon P, Laviron M, *et al.* Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *J Exp Med* 2018;215:2536–53.
- Casanova-Acebes M, Dalla E, Leader AM, *et al.* Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells. *Nature* 2021;595:578–84.
- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 2013;38:792–804.
- Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, *et al.* Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 2007;110:4077–85.
- Chorro L, Sarde A, Li M, *et al.* Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med* 2009;206:3089–100.
- Zhang L, Li Z, Skrzypczynska KM, *et al.* Single-cell analyses inform mechanisms of myeloid-targeted therapies in colon cancer. *Cell* 2020;181:e29:442–59.
- Wang J, Wang Y, Chu Y, *et al.* Tumor-derived adenosine promotes macrophage proliferation in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2021;74:627–37.
- Yang N, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, *et al.* Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998;54:143–51.
- Kurashige M, Kohara M, Ohshima K, *et al.* Origin of cancer-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages in humans after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Commun Biol* 2018;1:131.
- Anfray C, Umमारino A, Andón FT, *et al.* Current strategies to target tumor-associated-macrophages to improve anti-tumor immune responses. *Cells* 2019;9. doi:10.3390/cells9010046. [Epub ahead of print: 23 12 2019].
- Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *J Hematol Oncol* 2019;12:76.
- Kowal J, Kornete M, Joyce JA. Re-education of macrophages as a therapeutic strategy in cancer. *Immunotherapy* 2019;11:677–89.
- Pittet MJ, Michielin O, Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat Rev Clin Oncol* 2022;19:402–21.
- Piechotta M, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of cluster of differentiation 40 (CD40/TNFR5). *ESMO Open* 2019;4:e000510.
- Takimoto CH, Chao MP, Gibbs C, *et al.* The Macrophage 'Do not eat me' signal, CD47, is a clinically validated cancer immunotherapy target. *Ann Oncol* 2019;30:486–9.
- Jalil AR, Andrechak JC, Discher DE. Macrophage checkpoint blockade: results from initial clinical trials, binding analyses, and CD47-SIRP α structure-function. *Antib Ther* 2020;3:80–94.
- Zhang W, Huang Q, Xiao W, *et al.* Advances in anti-tumor treatments targeting the CD47/SIRP α axis. *Front Immunol* 2020;11:18.
- Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, *et al.* Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E4041–50.
- Wesolowski R, Sharma N, Reebel L, *et al.* Phase Ib study of the combination of pexidartinib (PLX3397), a CSF-1R inhibitor, and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Ther Adv Med Oncol* 2019;11:1758835919854238.
- Pradel LP, Ooi C-H, Romagnoli S, *et al.* Macrophage susceptibility to Emactuzumab (RG7155) treatment. *Mol Cancer Ther* 2016;15:3077–86.
- Jeannin P, Paolini L, Adam C, *et al.* The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *Febs J* 2018;285:680–99.
- Hamilton JA, Cook AD, Tak PP. Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2016;16:53–70.

- 39 Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, *et al.* Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8⁺ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 1999;162:5728–37.
- 40 Inaba K, Inaba M, Romani N, *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693–702.
- 41 Helft J, Böttcher J, Chakravarty P, *et al.* GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c(+)MHCII(+) macrophages and dendritic cells. *Immunity* 2015;42:1197–211.
- 42 Yan W-L, Shen K-Y, Tien C-Y, *et al.* Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2017;9:347–60.
- 43 Borrello I, Pardoll D. GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:185–93.
- 44 Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:3539–43.
- 45 Louis C, Cook AD, Lacey D, *et al.* Specific contributions of CSF-1 and GM-CSF to the dynamics of the mononuclear phagocyte system. *J Immunol* 2015;195:134–44.
- 46 Duluc D, Delneste Y, Tan F, *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007;110:4319–30.
- 47 Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, *et al.* Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol* 2012;188:5752–65.
- 48 Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, *et al.* Dual role of GM-CSF as a pro-inflammatory and a regulatory cytokine: implications for immune therapy. *J Interferon Cytokine Res* 2015;35:585–99.
- 49 Klemm F, Möckl A, Salameiro-Boix A, *et al.* Compensatory CSF2-driven macrophage activation promotes adaptive resistance to CSF1R inhibition in breast-to-brain metastasis. *Nat Cancer* 2021;2:1086–101.
- 50 Paolini L, Adam C, Beauvillain C, *et al.* Lactic acidosis together with GM-CSF and M-CSF induces human macrophages toward an inflammatory protumor phenotype. *Cancer Immunol Res* 2020;8:383–95.
- 51 Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014;513:559–63.
- 52 Zhang L, Li Z, Skrzypczynska KM, *et al.* Single-cell analyses inform mechanisms of Myeloid-Targeted therapies in colon cancer. *Cell* 2020;181:e29:442–59.
- 53 Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109–18.
- 54 Juntila IS. Tuning the cytokine responses: an update on Interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Front Immunol* 2018;9:888.
- 55 Zhou W, Guo S, Liu M, *et al.* Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy. *Curr Med Chem* 2019;26:3026–41.
- 56 Panni RZ, Herndon JM, Zuo C, *et al.* Agonism of CD11b reprograms innate immunity to sensitize pancreatic cancer to immunotherapies. *Sci Transl Med* 2019;11. doi:10.1126/scitranslmed.aau9240. [Epub ahead of print: 03 07 2019].
- 57 Preisser L, Miot C, Le Guillou-Guillemette H, *et al.* IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* 2014;60:1879–90.
- 58 Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res* 2015;3:1–11.
- 59 Counihan JL, Grossman EA, Nomura DK. Cancer metabolism: current understanding and therapies. *Chem Rev* 2018;118:6893–923.
- 60 Luengo A, Gui DY, Vander Heiden MG. Targeting metabolism for cancer therapy. *Cell Chem Biol* 2017;24:1161–80.
- 61 Zaidi MR. The interferon-gamma paradox in cancer. *J Interferon Cytokine Res* 2019;39:30–8.
- 62 Pietilä TE, Veckman V, Kyllönen P, *et al.* Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in Salmonella-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2005;78:909–20.
- 63 Darwich L, Coma G, Peña R, *et al.* Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology* 2009;126:386–93.
- 64 Yan J, Smyth MJ, Teng MWL. Interleukin (IL)-12 and IL-23 and their conflicting roles in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10:a028530.
- 65 Park S, Cheon S, Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell Mol Immunol* 2007;4:329–35.
- 66 Ma HS, Poudel B, Torres ER, *et al.* A CD40 agonist and PD-1 antagonist antibody reprogram the microenvironment of Nonimmunogenic tumors to allow T-cell-mediated anticancer activity. *Cancer Immunol Res* 2019;7:428–42.
- 67 Martinez FO, Helming L, Milde R, *et al.* Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 2013;121:e57–69.
- 68 Gaggiani M, Turdo A, Chinnici A, *et al.* IL4 primes the dynamics of breast cancer progression via DUSP4 inhibition. *Cancer Res* 2017;77:3268–79.
- 69 Srabovici N, Mujagic Z, Mujanovic-Mustedanagic J, *et al.* Interleukin 13 expression in the primary breast cancer tumour tissue. *Biochem Med* 2011;21:131–8.
- 70 Suzuki A, Leland P, Joshi BH, *et al.* Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. *Cytokine* 2015;75:79–88.
- 71 Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* 2016;44:450–62.
- 72 Serezani APM, Bozdogan G, Sehra S, *et al.* IL-4 impairs wound healing potential in the skin by repressing fibronectin expression. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:142–51.
- 73 Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41:14–20.
- 74 Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, *et al.* The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* 2010;87:59–67.
- 75 Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010;115:e10–19.
- 76 Raes G, Van den Bergh R, De Baetselier P, *et al.* Arginase-1 and Ym1 are markers for murine, but not human, alternatively activated myeloid cells. *J Immunol* 2005;174:6561–2.
- 77 Zilionis R, Engblom C, Pfirschke C, *et al.* Single-cell transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations across individuals and species. *Immunity* 2019;50:e10:1317–34.
- 78 Moganti K, Li F, Schmutzmaier C, *et al.* Hyperglycemia induces mixed M1/M2 cytokine profile in primary human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* 2017;222:952–9.
- 79 Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, *et al.* An immune atlas of clear cell renal cell carcinoma. *Cell* 2017;169:e18:736–49.
- 80 Azizi E, Carr AJ, Plitas G, *et al.* Single-cell map of diverse immune phenotypes in the breast tumor microenvironment. *Cell* 2018;174:e36:1293–308.
- 81 Müller S, Kohanbash G, Liu SJ, *et al.* Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol* 2017;18:234.
- 82 Mitsi E, Kamng'ona R, Rylance J, *et al.* Human alveolar macrophages predominantly express combined classical M1 and M2 surface markers in steady state. *Respir Res* 2018;19:66.
- 83 Chen Y-C, Shi W, Shi J-J, *et al.* Progress of CD47 immune checkpoint blockade agents in anticancer therapy: a hematotoxic perspective. *J Cancer Res Clin Oncol* 2022;148:1–14.
- 84 Shi R, Chai Y, Duan X, *et al.* The identification of a CD47-blocking "hotspot" and design of a CD47/PD-L1 dual-specific antibody with limited hemagglutination. *Signal Transduct Target Ther* 2020;5:16.
- 85 Dheilly E, Moine V, Broyer L, *et al.* Selective blockade of the ubiquitous checkpoint receptor CD47 is enabled by dual-targeting bispecific antibodies. *Mol Ther* 2017;25:523–33.
- 86 Liu B, Guo H, Xu J, *et al.* Elimination of tumor by CD47/PD-L1 dual-targeting fusion protein that engages innate and adaptive immune responses. *MAbs* 2018;10:315–24.
- 87 Helft J, Böttcher J, Chakravarty P, *et al.* GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 2015;42:1197–211.

Correction: *Antitumor strategies targeting macrophages: the importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages*

Monnier M, Paolini L, Vinatier E, *et al.* Antitumor strategies targeting macrophages: the importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages. *J Immunother Cancer* 2022;10:e005560. doi: 10.1136/jitc-2022-005560

The affiliations of Alberto Mantovani have been updated.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© Author(s) (or their employer(s)) 2023. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

J Immunother Cancer 2023;11:e005560corr1. doi:10.1136/jitc-2022-005560corr1



Titre : Analyse du rôle des corps cétoniques dans la polarisation fonctionnelle des macrophages humains – impact sur le processus de réparation tissulaire

Mots clés : macrophages, polarisation, acétoacétate, diète cétogène, réparation tissulaire

Résumé : Les macrophages sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Ils présentent donc une grande diversité de fonction, associée à une multitude de phénotypes. L'acquisition du phénotype est dictée par la nature et la quantité de signaux présents, localement, dans le tissu dans lequel ils résident. De plus, le phénotype des macrophages s'adapte aux modifications de son environnement. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont souligné le rôle des métabolites dans la polarisation des macrophages. Dans cette étude, nous avons évalué l'impact du corps cétonique acétoacétate (AcAc) sur la polarisation fonctionnelle des macrophages humains.

Les résultats montrent que l'AcAc induit in vitro des macrophages réparateurs avec l'expression séquentielle de gènes impliqués dans le processus de réparation tissulaire. Ce processus est médié par des modifications épigénétiques impliquant la méthylation de l'histone H3K27. Enfin, nous avons observé qu'un régime cétogène accélère la fermeture des plaies dans un modèle murin de cicatrisation de plaie cutanée et que cette réponse est associée à la présence, dans la peau, de macrophages présentant un phénotype réparateur. En conclusion, cette étude identifie l'AcAc comme un métabolite favorisant la génération de macrophages réparateurs et montre qu'un régime cétogène accélère la cicatrisation in vivo.

Title: Role of ketone bodies on the polarization of macrophages – impact on the wound-healing process

Keywords: macrophages, polarization, acetoacetate, ketogenic diet, wound healing

Abstract: Macrophages are involved in many physiological processes. They therefore exhibit a large diversity of functions associated with a multitude of phenotypes. The acquisition of the phenotype is dictated by the nature and the quantity of signals present, locally, in the tissue in which they reside. Recent studies have underlined the pivotal role played by metabolites in the polarization of macrophages. In this study, we evaluated the impact of the ketone body acetoacetate (AcAc) on the polarization of human macrophages. Results show that AcAc induces macrophages with a wound-healing phenotype, characterized the time-dependent expression of a set of genes involved in tissue repair.

This process is mediated by epigenetic modifications involving histone H3K27 methylation. Finally, we observed that a ketogenic diet accelerates wound closure in a murine model of cutaneous wound healing, and that this process is associated with the presence, in the skin, of macrophages with a tissue repair phenotype.

In conclusion, this study identifies AcAc as a unique metabolite capable of promoting the generation of macrophages with a wound healing phenotype and shows that a ketogenic diet accelerates the wound-healing process in vivo.