HAL open science

Caractérisation des bases moléculaires et cellulaires de la reprogrammation fonctionnelle radio-induite des macrophages dans le cadre du traitement du cancer

Aurélia Deva Nathan

To cite this version:

Aurélia Deva Nathan. Caractérisation des bases moléculaires et cellulaires de la reprogrammation fonctionnelle radio-induite des macrophages dans le cadre du traitement du cancer. Cancer. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL079 . tel-04721199

HAL Id: tel-04721199

https://theses.hal.science/tel-04721199v1

Submitted on 4 Oct 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.

Caractérisation des bases moléculaires et cellulaires de la reprogrammation fonctionnelle radio-induite des macrophages dans le cadre du traitement du cancer

Characterization of the molecular and cellular bases of radiation-induced functional reprogramming of macrophages in cancer treatment

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 : cancérologie : biologie – médecine – santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Sciences du cancer
Graduate School : Sciences de la vie et santé. Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Radiothérapie Moléculaire et Innovation Thérapeutique (U1030, Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Inserm)**, sous la direction du Dr. **Jean-Luc PERFETTINI**, directeur de recherche.

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 2 octobre 2023, par

Aurélia DEVA NATHAN

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Nathalie CHAPUT-GRAS PU-PH, Université Paris-Saclay	Présidente
Alexandre BOISSONNAS DR, Inserm, Sorbonne Université	Rapporteur & Examinateur
Jean-Pierre POUGET DR, Inserm, Université de Montpellier	Rapporteur & Examinateur
Catherine BRENNER DR, CNRS, Université Paris-Saclay	Examinatrice
Hélène CASTEL DR, Inserm, Université Rouen Normandie	Examinatrice

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2023UPASL079

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu, le Dr. Jean-Luc PERFETTINI, mon directeur de thèse, pour l'encadrement apporté depuis mon stage de master 2, il y a bientôt quatre ans. Je te remercie pour l'opportunité ainsi que la confiance que tu m'as accordée pour mener à bien cette thèse. Merci d'avoir toujours fait en sorte que tous les moyens soient présents pour que mes travaux aboutissent.

J'exprime ma sincère gratitude envers le Dr. Alexandre BOISSONNAS et le Dr. Jean-Pierre POUGET pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, en qualité de rapporteur. Je remercie également la Dr. Catherine BRENNER, la Dr. Hélène CASTEL et la Pr. Nathalie CHAPUT de me faire l'honneur d'examiner ma thèse. A tous, je vous remercie de l'intérêt et du temps accordés.

Je tiens à remercier grandement l'ensemble des membres composant notre équipe de recherche. En particulier, à Ali MOSTEFA-KARA et Anaïs CHAPEL, je vous remercie sincèrement pour votre collaboration scientifique sur ces travaux de recherche ainsi que l'aide apportée surtout les derniers mois. Je vous souhaite de poursuivre ce projet aux multiples horizons encore plus loin. Merci également à Awatef ALLOUCH, d'avoir toujours su m'accorder de son temps et d'avoir été une oreille attentive à mes questionnements scientifiques tout au long de ma thèse. Je remercie aussi Yara BOU-GHOSN pour la douceur qu'elle a su apporter à mes journées au laboratoire cette dernière année. Je te souhaite tout le meilleur pour la poursuite de ta thèse, dans laquelle je suis sure, tu excelleras comme toujours. Un grand merci à Arianna MARINELLO, Cassandre VEDEL, Trang Tranh CAO-PHAM et Valentine FOURNIER pour tous les échanges scientifiques que nous avons partagés.

Je souhaite adresser mes profonds remerciements à l'ensemble de l'unité Inserm 1030. A Nathalie VIOLA, merci d'avoir toujours fait en sorte que notre vie au laboratoire se passe pour le mieux et d'avoir été un important soutien moral. A Winchygn LIU, je te remercie sincèrement pour tout ce que tu apportes au quotidien à notre unité ainsi que pour ta constante bienveillance et écoute, qui m'ont été très précieuses. A Lydia MEZIANI, un profond merci teinté d'admiration pour l'ensemble de tes qualités humaines et scientifiques, que tu partages sans retenue et qui m'inspirent tant. Je remercie également Michele MONDINI et Paul BERGERON pour votre bonne humeur débordante qui a su alléger mon quotidien quand il le fallait. Merci à Pierre-Antoine LAURENT pour toutes nos discussions et surtout pour toutes tes anecdotes de vie qui me resteront en tête. Je remercie Céline CLEMENSON et Marine GERBE-DE-THORE pour la gentillesse dont vous m'avez toujours fait part. Enfin, merci à Lisa SITTERLE d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions de physique des rayonnements.

Un immense merci à l'ensemble des plateformes de Gustave Roussy, notamment celle de cytométrie et d'imagerie pour toute l'aide apportée dans ce projet. Je remercie tous les

collaborateurs avec lesquels j'ai pu échanger et travailler, et en particulier l'unité 9018 METSY, avec laquelle j'ai pris plaisir à collaborer.

Enfin, un merci tout particulier à Léa POISOT, la meilleure assistante d'école doctorale qui soit. Merci d'avoir toujours été disponible pour moi et d'avoir toujours su répondre à mes (nombreuses) questions, toujours avec la bienveillance qui te caractérise.

Je souhaite adresser maintenant mes plus sincères remerciements à l'ensemble de mes proches, à commencer par Déborah LECUYER, Désirée TANNOUS et Emie GUTIERREZ-MATEYRON, collègues de thèse devenues de véritables Amies. Votre soutien indéfectible au cours de ces 3 années m'a été plus qu'essentiel. Je ne trouverai jamais de mots assez forts pour vous décrire toute la reconnaissance que je vous en porte. Merci de m'avoir tant appris et tant fait grandir scientifiquement mais également humainement. Vivre cette thèse à vos côtés a été un réel bonheur et ma plus grande chance. Tous les moments passés ensemble au laboratoire, marqués par nos rires incessants, nos chansons revisitées, nos taquineries légendaires resteront des moments de vie précieux, gravés en moi à jamais et je sais qu'il nous reste à vivre le meilleur devant nous.

A l'ensemble de mes amies et amis d'enfance, du lycée et de la fac, trop nombreux pour être cités un à un, mais qui mériteraient chacun un mot tant leur immuable amitié me porte au quotidien. Je vous remercie d'être toujours à mes côtés et de faire partie intégrante de mon équilibre depuis tant d'années. Un petit clin d'œil à Noémie BONNEAU et Pauline LEAL, avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger sur nos déboires et réussites de thèses respectives tout au long de ces trois ans. Enfin, en particulier à Lori BERREHOUC, Matthieu ARGAUD, Inès BOUZOUANE, Nassim BENAISSA, Marie-Amélie BARNOUIN et Eugénie LAMBOROT, je vous remercie pour tout le soutien et la patience que vous m'avez m'accordés au cours de ma thèse et d'avoir toujours trouvé les bons mots pour m'encourager et me pousser toujours plus haut.

Enfin, j'ai une profonde reconnaissance envers ma grande famille, pour leur amour et soutien indéfectible qu'ils m'apportent depuis toujours. Merci d'être présents que ce soit à distance ou non, malgré la barrière de la langue ou non, vous m'accompagnez et me portez dans chacune de mes étapes de vie, comme celle-ci. En particulier à mes parents et ma sœur, je vous remercie pour tout ce que vous m'apportez au quotidien, et surtout pour toute la patience et le soutien dont vous m'avez fait part durant ma thèse. Merci de toujours croire en moi plus que je ne crois en moi-même. Papa et Maman, merci d'avoir toujours fait en sorte que je ne manque de rien, votre amour inconditionnel me porte toujours plus haut. A ma petite sœur, Elisa, merci d'avoir su m'écouter, m'encourager et me remettre sur pied quand il le fallait, toujours avec ta générosité de cœur et ta bienveillance éternelle qui te définissent tant. Enfin, à mes grands-parents, Mamie, பாட்டி, Papy et தாத்தா, vos choix de vie m'ont permis d'en être là où j'en suis aujourd'hui et pour cela je vous en serai éternellement reconnaissante.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations **9**
Liste des figures **15**
Liste des tables **16**
Introduction **17**
1. Les macrophages **17**
1.1. Origine et développement des macrophages 17
1.1.1. Origine des macrophages 17
1.1.2. Développement des macrophages et spécialisation tissulaire 19
1.1.2.1. Monocytes 19
1.1.2.1.1. Voies de développement des monocytes 19
1.1.2.1.2. Les différents sous-types de monocytes 22
1.1.2.1.3. Facteurs nécessaires au développement de la lignée monocytaire 24
1.1.2.2. Macrophages dérivés de la moelle osseuse 25
1.1.2.3. Macrophages résidents tissulaires 25
1.1.2.3.1. Selon leur origine 25
1.1.2.3.2. Selon leur microenvironnement tissulaire 26
1.2. Les activités biologiques des macrophages 29
1.2.1. La migration 29
1.2.2. La phagocytose 30
1.2.3. La présentation de l'antigène 31
1.2.4. La cytotoxicité induite 32
1.2.4.1. Les espèces réactives de l'oxygène 32
1.2.4.2. Les espèces réactives de l'azote 33
1.2.5. La production de cytokines/chimiokines 34
1.2.5.1. Cytokines 34
1.2.5.2. Chimiokines 35
1.3. L'activation des macrophages 36
1.3.1. Nomenclature classique 36
1.3.2. Nomenclature revisitée 37
1.3.3. Les principales voies de régulation de l'activation des macrophages 39
1.3.3.1. Les facteurs de transcription 39
1.3.3.1.1. Les facteurs transducteurs de signaux et activateurs de transcription 39
1.3.3.1.2. Les facteurs régulateurs de l'interféron (IRFs) 39
1.3.3.1.3. Le facteur nucléaire NF-κB 41
1.3.3.1.4. L'axe CREB-C/EBPβ 41

1.3.3.1.5. Les récepteurs nucléaires PPAR 42
1.3.3.1.6. Les facteurs de type Krüppel (KLF) 42
1.3.3.2. Les facteurs immunométaboliques 42
1.3.3.2.1. Généralités sur la dynamique mitochondriale 43
1.3.3.2.2. La dynamique mitochondriale module l'activation des macrophages 44
1.3.3.3. Les facteurs épigénétiques 46
1.3.3.3.1. Les modifications post-transcriptionnelles des histones 46
1.3.3.3.2. La méthylation de l'ADN 47
1.3.3.3.3. La modification d'expression des microARN 47
1.4. Le rôle des macrophages dans le développement des pathologies 47
1.4.1. Généralités 47
1.4.2. Cancer et macrophages associés aux tumeurs (TAMs) 48
1.4.2.1. Origine des TAMs 48
1.4.2.2. Initiation tumorale et TAMs 50
1.4.2.3. Fonctions des TAMs 50
1.4.2.3.1. Fonctions anti-tumorales 51
1.4.2.3.2. Fonctions pro-tumorales 51
1.4.2.4. Invasion tumorale et TAMs 53
1.4.2.5. Résistance thérapeutique et TAMs 53
1.4.2.6. Ciblage thérapeutique des TAMs 54
1.4.2.6.1. L'inhibition du recrutement des TAMs 54
1.4.2.6.2. L'inhibition de la survie des TAMs 54
1.4.2.6.3. L'induction des propriétés anti-tumorales des TAMs 55
1.4.2.6.4. La reprogrammation fonctionnelle des TAMs 55
2. La radiothérapie 59
2.1. De la découverte jusqu'au traitement du cancer 59
2.2. La radiobiologie 60
2.2.1. Les radiations ionisantes 60
2.2.2. Effets cellulaires directs et indirects 61
2.2.2.1. Dommages à l'ADN 62
2.2.2.2. Micronoyaux et instabilité génomique 64
2.2.2.3. Dysfonctionnement mitochondrial 65
2.2.3. Les conséquences fonctionnelles des radiations ionisantes 66
2.2.3.1. L'induction de processus de mort cellulaire 66
2.2.3.1.1. Processus de mort cellulaire typique 66
2.2.3.1.2. Processus de mort cellulaire atypique 68
2.2.3.1.3. Sénescence 68

2.2.3.2. Effets non ciblés des rayonnements ionisants 69
2.2.3.2.1. Effet abscopal 69
2.2.3.2.2. Effet bystander 69
2.2.3.3. Les conséquences immunologiques des radiations ionisantes 70
2.2.3.3.1. Mort cellulaire radio-induite immunogène 70
2.2.3.3.2. Réponse cellulaire immunostimulatrice (cGAS-STING-IFN type I) 72
2.2.3.3.3. Effets sur le microenvironnement tumoral 74
2.3. Les effets de la RT sur la reprogrammation fonctionnelle des macrophages 76
2.3.1. Modulation d'induction de l'activation radio-induite des macrophages 77
2.3.2. Voies de signalisation impliquées 78
2.3.2.1. La voie NF-κB 78
2.3.2.2. La kinase ATM 79
2.3.2.3. La voie des MAPK 80
2.4. Les cibles d'intérêt pour potentialiser la reprogrammation radio-induite des macrophages 80
2.4.1. Les cibles d'intérêt principales 80
2.4.2. Cibler les récepteurs purinergiques 81
2.4.2.1. Généralités 81
2.4.2.1.1. La signalisation purinergique 82
2.4.2.1.2. Les familles de récepteurs purinergiques 83
2.4.2.1.3. Expression des récepteurs purinergiques au niveau des macrophages 86
2.4.2.2. Modulation des activités biologiques des macrophages par les récepteurs purinergiques 87
2.4.2.2.1. La migration 87
2.4.2.2.2. La phagocytose 88
2.4.2.2.3. La présentation de l'antigène 89
2.4.2.2.4. La cytotoxicité 90
2.4.2.2.5. La production de cytokines/chimiokines 90
2.4.2.3. Modulation de l'activation des macrophages par les récepteurs purinergiques 92
2.4.2.4. Implications des récepteurs purinergiques dans le TME 94
2.4.2.4.1. La signalisation purinergique dans le TME 95
2.4.2.4.2. Les effets de la signalisation purinergique sur le TME 96
2.4.2.4.3. Ciblage thérapeutique des récepteurs purinergiques dans le TME 99
Objectifs 102
Resultats 103
Discussion 145
1. L'activation de la protéine cGAS dépend de la protéine DRP1 et déclenche la reprogrammation fonctionnelle radio-induite des macrophages. 146

2. L'inhibition de P2Y2 augmente la capacité des macrophages à être reprogrammés de façon pro-inflammatoire. 149
3. L'implication de la protéine NLRP3 dans l'activation pro-inflammatoire des macrophages 150
4. La combinaison de la radiothérapie et l'inhibition du récepteur P2Y2 augmente la capacité des macrophages irradiés à être activés de façon pro-inflammatoire. 151
5. L'activation pro-inflammatoire des macrophages *in vitro* 152
Perspectives 153
Bibliographie 154
Annexes 190
ANNEXE 1 : The purinergic receptor P2Y2 acts as an endogenous repressor of the NLRP3 inflammasome activation during SARS-CoV-2 infection and inflammation 190
ANNEXE 2 : The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection. 232

LISTE DES ABREVIATIONS

3D-CRT : radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle
9-1-1 : complexe RAD9-RAD-1-HUS-1

A

AC : adénylate cyclase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNmt : ADN mitochondrial
ADP : adénosine diphosphate
AMP : adénosine monophosphate
AMPc : AMP cyclique
APAF-1 : facteur d'activation de l'apoptose-protéase 1
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
ATM : *ataxia telangiectasia mutated*
ATP : adénosine triphosphate
ATR : *ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*

B

BCG : Bacille de Calmette et Guérin
BRCA1 : protéine du gène 1 du cancer du sein
bZIP : *basic region leucine zipper*

C

C/EBP : *CCAAT/Enhancer-Binding Protein*
Ca^{2+} : ions calciques
CAFs : fibroblastes associés aux cancers
CaMKIα : protéine kinase α dépendante du calcium et de la calmoduline
CAR-M : *Chimeric Antigenic Receptor-Macrophages*
CDB : cassure double brin
CDC25 : phosphatase du cycle de division cellulaire 25
Cdk1 : kinase dépendante des cyclines 1
CDP : progéniteur commun de cellules dendritiques
cGAMP : GMP-AMP cyclique
cGAS : GMP-AMP cyclique synthase
CH_3 : groupe méthyle
Chk1 : kinase 1 du point de contrôle
Chk2 : kinase 2 du point de contrôle
CLP : progéniteur lymphoïde commun
cMoP : progéniteur monocyte commun

CMP : progéniteur myéloïde commun
CPA : cellule présentatrice d'antigène
CpG : 5'-cytosine-phosphate-guanine-3'
CREB : protéine de liaison de l'élément répondant à l'AMPc
CRT : calréticuline
CSB : cassure simple brin
CSF-1 : *colony stimulating factor 1*
CSF-1R : *colony stimulating factor 1 receptor*
CSF-2 : *colony stimulating factor 2*
CSH : cellules souches hématopoïétiques

D

DAMPs : motifs moléculaires associés aux dégâts
DC : cellules dendritiques
DISC : complexe de signalisation induisant la mort
DNMT : ADN méthyltransférase
DRP1 : protéine 1 apparentée à la dynamine

E

EBRT : *external beam radiotherapy*
EMC : matrice extracellulaire
EMT : transition épithélio-mésenchymateuse
ENT : transporteurs de nucléosides équilibrants
ERK1 : signal extracellulaire 1
ERK2 : signal extracellulaire 2

F

FcγR : récepteurs Fc gamma ou récepteurs des immunoglobulines
FDA : *Food and Drug Administration*
Fis1 : protéine de fission mitochondriale 1

G

GMP : progéniteur de granulocytes/monocytes
GMP-AMPc : guanosine monophosphate – adénosine monophosphate cyclique
G-MSCF : *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
GTP : guanosine triphosphate

H

H_2O_2 : peroxyde d'oxygène
H3K27 : lysine 27 sur l'histone 3
H3K4 : lysine 4 sur l'histone 3

H3K9me3 : triméthylation de la lysine 9 de l'histone 3
HDACs : histones désacétylases
HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
HIF : facteur induit par l'hypoxie
HLA : *Human Leukocyte Antigen*
hMDMs : macrophages dérivés de monocytes
HMGB1 : *high-mobility group box 1*
HSP : protéine de choc thermique

I

ICB : inhibiteur des points de contrôle immunitaires
ICD : mort cellulaire immunogène
IDO : indoleamine-2,3-dioxygenase
IFN-I : interféron de type I
IFN-γ : interféron gamma
IGRT : radiothérapie guidée par l'image
IkB : protéines inhibitrices de NF-κB
IKK : kinase de l'IkB
IL : interleukine
IL1-Ra : antagoniste du récepteur de l'IL-1
IMRT : RT à modulation d'intensité
iNOS : oxydes nitriques synthases inductible
IRF : facteur de régulation de l'interféron

J

JAK : *Janus kinase*
JMJD3 : *Jumonji domain-containing-3*
JNK : kinase JUN N-terminale

K

K : résidus lysine
K^+ : ions potassiques
KLF : facteurs de type Krüppel

L

LPS : lipopolysaccharide

M

MAMs : macrophages associés aux métastases
MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes
M-CSF : *macrophage colony stimulating factor*

M-CSFR : *macrophage colony stimulating factor receptor*
MDP : progéniteur des monocytes et des DC
MEC : matrice extra-cellulaire
MEP : progéniteur de mégacaryocytes/érythrocytes
MFF : facteur de fission mitochondriale
MFN1 : mitofusine 1
MFN2 : mitofusine 2
MHC/CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
MiD49 : protéine du dynamisme mitochondriale de 49kDa
MiD51 : la protéine du dynamisme mitochondriale de 51kDa
miRs : microARN
MMP : métalloprotéases
MOMP : perméabilisation de la membrane externe mitochondriale
MP : précurseur de monocyte
MRN : complexe MRE11-RAD50-NBS1
mtROS : ROS mitochondriaux

N

Na^+ : ions sodiques
NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NEMO : modulateur essentiel de NF-κB
NETs : pièges extracellulaires issus des neutrophiles
NF-κB : facteur nucléaire kappa B
NHEJ : jonction non homologue
NK : cellules *natural killer*
NO : monoxyde d'azote
NO_2^- nitrites
NOS : oxyde nitrique synthase
NOX : NADPH oxydase
NTPDase 1 : ecto-nucléoside triphosphate disphosphohydrolase 1

O

$O_2^{\bullet -}$: anion superoxyde
$OH^\bullet$: radical hydroxyle
$ONOO^-$: peroxynitrite
OPA1 : protéine 1 de l'atrophie optique

P

PAMPs : motifs moléculaires associés aux microbes
PC-1 : ectonucléotide pyrophosphatase-phosphodiestérase 1

PD-L1 : ligand 1 de la mort programmée
PKA : protéine kinase A
PLC : phospholipase C
PlGF : facteur de croissance placentaire
PPAR : *peroxysome proliferator-activated receptor*
PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs

R

RE : réticulum endoplasmique
RI : rayonnements ionisants
RNS : espèce réactive de l'azote
ROS : espèce réactive de l'oxygène
RPA : protéine de réplication A
RT : radiothérapie

S

S616 : phosphorylation de la sérine 616
S637 : phosphorylation de la sérine 637
SARS-CoV-2 : coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
SASP : phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SBRT : radiothérapie corporelle stéréotaxique
SOCS : suppresseurs de la signalisation des cytokines
SPM : système de phagocytes mononuclés
STAT : *signal transducers and activators of transcription*
STING : stimulateur des gènes de l'interféron

T

TAMs : macrophages associés aux tumeurs
TANs : neutrophiles associés aux tumeurs
TBK1 : *TANK-binding kinase 1*
TGF-β : facteur de croissance transformant beta
Th1 : lymphocytes T helper de type 1
Th2 : lymphocytes T helper de type 2
TEL : transfert d'énergie linéaire
TLR : récepteur de type Toll
TME : microenvironnement tumoral
TNF-α : *tumor necrosis factor alpha*
TP : thymidine phosphorylase
Treg : lymphocytes T régulateurs

U

UDP : uridine diphosphate

UTP : uridine triphosphate

V

VDAC2 : canal anionique voltage-dépendant 2

VEGF : croissance de l'endothélium vasculaire

W

WNT7B : membre de la famille Wnt 7B

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Origine embryonnaire des macrophages. 18
Figure 2 – Origine des macrophages résidents du stade embryonnaire à l'âge adulte à l'état stable. 19
Figure 3 - Voie de développement classique des monocytes. 20
Figure 4 - Voie de développement des monocytes revisitée chez la souris. 21
Figure 5 - Modèle multidimensionnel du développement des macrophages. 28
Figure 6 - Exemples de récepteurs à la surface des macrophages initiant la phagocytose d'une cellule apoptotique. 31
Figure 7 - Génération de ROS et RNS au niveau des macrophages. 34
Figure 8 - Directives proposées pour décrire l'activation des macrophages. 38
Figure 9 - Régulation de la fusion et la fission mitochondriale. 44
Figure 10 - Différences de morphologie mitochondriale entre fusion et fission 44
Figure 11 - L'origine des TAMs est dépendante du tissu. 49
Figure 12 - Les signaux du TME orientant les fonctions des TAMs. 50
Figure 13 - Exemples des fonctions pro-tumorales des TAMs. 52
Figure 14 - Chronologie de l'entrée en clinique des principales stratégies ciblant les TAMs. 54
Figure 15 - Exemples de stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs. 56
Figure 16 - Les trois principaux processus d'interaction des photons en RT. 61
Figure 17 - La signalisation des voies de dommages à l'ADN. 63
Figure 18 - Mécanismes de formation des micronoyaux 64
Figure 19 – Exemples des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans les processus de mort cellulaire induits par les RI 66
Figure 20 - Schéma des mécanismes moléculaires de la sécrétion d'ATP durant la mort cellulaire immunogène 71
Figure 21 - Vue d'ensemble de la voie de signalisation cGAS/STING. 73
Figure 22 - Effet de la RT sur le microenvironnement tumoral. 76
Figure 23 - Réseau des ectonucléotidases. 83
Figure 24 - L'activation des récepteurs à adénosine. 84
Figure 25 - Activation du système purinergique. 86
Figure 26 - Modèle proposé de signalisation purinergique autocrine. 88
Figure 27 - Exemples de l'influence de la signalisation purinergique sur la sécrétion de cytokines des macrophages. 92
Figure 28 - Exemples de l'influence de la signalisation purinergique sur la polarisation des macrophages. 93
Figure 29 - Modulation des réponses immunitaires par la signalisation purinergique au niveau du TME. 97
Figure 30 - Modulation des voies de signalisation d'activation des TAMs par l'adénosine. 99

LISTE DES TABLES

Table 1 - Expression monocytaire des marqueurs de surface par espèces et sous-populations. 23
Table 2 - Exemples de macrophages résidents et la spécificité de leur développement. 27
Table 3 - Cibles thérapeutiques majoritaires visant la reprogrammation fonctionnelle des TAMs. 58
Table 4 - Combinaison de la RT avec des agents ciblant la reprogrammation des TAMs. 81
Table 5 – Agonistes endogènes des différents récepteurs purinergiques P2. 85

INTRODUCTION

1. LES MACROPHAGES

1.1. Origine et développement des macrophages

Les macrophages sont des cellules immunitaires myéloïdes, observées pour la première fois par Elie Metchnikoff. Cette découverte a valu à ce dernier conjointement avec Paul Ehrlich, un prix Nobel en 1908 en reconnaissance de leurs apports majeurs sur le fonctionnement de l'immunité. Le terme macrophage tient pour « gros mangeurs » en grec, caractérisant ainsi leur fonction première : la phagocytose, c'est-à-dire l'ingestion de particules, de micro-organismes. Il s'agit en autres d'un mécanisme de défense actif, qui a donné naissance au concept d'immunité innée (1). Au-delà de cette capacité première à engloutir les micro-organismes étrangers, il a été montré que les macrophages jouent également un rôle d'homéostasie tissulaire, notamment dans le développement, la réparation ou encore le remodelage des tissus.

1.1.1. Origine des macrophages

Les macrophages se composent de deux classes : les macrophages résidants dans les tissus et les macrophages infiltrants. Les premiers, par définition, résident et exécutent des fonctions homéostatiques dans leurs tissus respectifs à l'état d'équilibre (e.g. les cellules de Kupffer du foie, la microglie, les macrophages pulmonaires…). A l'inverse, les seconds, les macrophages infiltrants ne sont retrouvés que dans un contexte inflammatoire/pathologique. S'il est bien établi que les monocytes circulants sanguins représentent la source des macrophages infiltrants, cela n'est pas le cas pour les macrophages résidents des tissus.

A la fin des années 1960, van Furth et ses collègues définissent le système de phagocytes mononuclées (SPM), qui regroupe les promonocytes et leurs précurseurs dans la moelle osseuse, les monocytes dans le sang périphérique et les macrophages. Ils établissent le concept fondamental suivant : « l'ensemble des macrophages, y compris les macrophages résidents des tissus, sont issus des monocytes sanguins et maintenus par ces derniers » (2). Les monocytes et les macrophages sont ainsi considérés comme deux types cellulaires apparentés qui proviennent d'un continuum de différenciation.

Ces dernières années, de nombreuses publications ont radicalement révisé notre compréhension de l'origine des macrophages, notamment par trois découvertes clés. Premièrement, les monocytes sanguins circulants ne contribuent pas substantiellement aux macrophages résidents des tissus ni dans un état stable, ni dans un état inflammatoire. Des études de traçage de lignées (3,4), ainsi que des modèles murins de parabiose (4) ont permis de démontrer la contribution minimale des monocytes circulants à la maintenance des

macrophages résidents tissulaires. Deuxièmement, les macrophages résidents des tissus présents à l'âge adulte dérivent de précurseurs embryonnaires issus du sac vitellin embryonnaire ou du foie fœtal, et qui migrent dans les tissus avant la naissance (**Figure 1**). Cela a été montré pour la première fois avec des études *in vivo* de traçage de lignées, qui ont établi que la microglie adulte dérivait de progéniteurs myéloïdes primitifs embryonnaires (5). Enfin, la dernière découverte a été celle que les macrophages résidents tissulaires d'origine embryonnaire peuvent se maintenir eux-mêmes à l'âge adulte par auto-renouvellement (4).

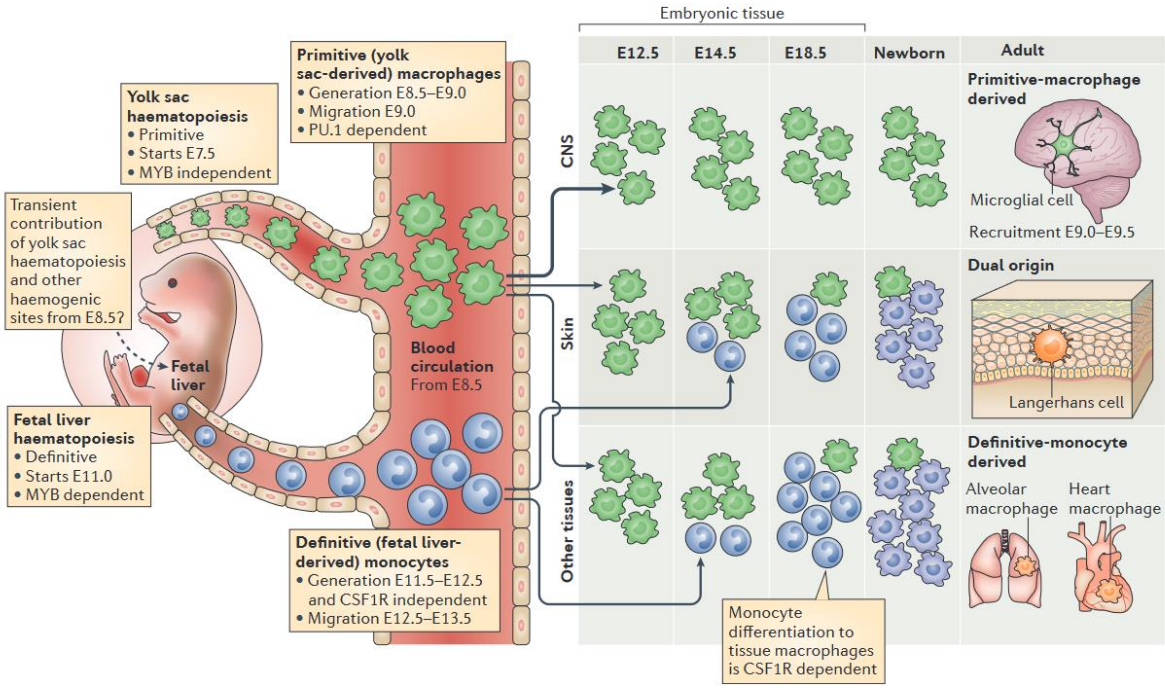


Figure 1 - Origine embryonnaire des macrophages.
Au début de la gestation, les macrophages sont observés pour la première fois au cours de l'hématopoïèse primitive et se développent dans le sac vitellin extra-embryonnaire. Par la suite, l'hématopoïèse définitive se met en place au niveau du foie fœtal. Elle résulte de la migration de progéniteurs hématopoïétiques provenant du sac vitellin, puis de l'endothélium hématogène de la région de l'aorte-gonade-mésonéphros (AGM). Les monocytes sont ainsi générés au sein du foie fœtal, libérés dans la circulation sanguine et recrutés dans les tissus fœtaux, où ils se différencient en macrophages (6).

Avec ces découvertes, plusieurs modèles pour décrire l'origine des macrophages résidents des tissus ont été proposés et sont encore beaucoup discutés (7,8). Il est cependant communément admis que l'origine des macrophages résidents varie en fonction de l'âge mais également du tissu. Au sein du tissu adulte, certains macrophages peuvent être issus d'une origine embryonnaire, alors que d'autres peuvent dériver de monocytes issus de l'hématopoïèse. Ainsi, certaines populations de macrophages seraient dépendantes de populations dérivées de précurseurs embryonnaires et se maintiendraient par auto-renouvellement jusqu'à l'âge adulte, notamment dans le cerveau, l'épiderme, le foie et le poumon (4,8–10). D'autres populations, au contraire, seraient remplacées par des précurseurs

monocytaires adultes au cours du temps, notamment au niveau des intestins, de la peau, du cœur et du pancréas (8,11–14) (**Figure 2**).

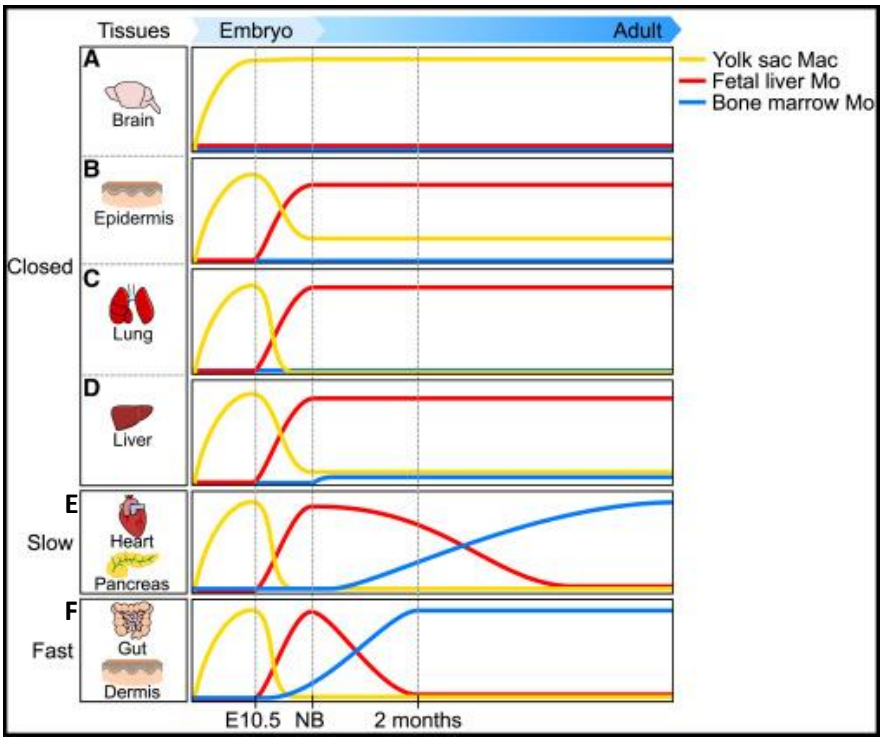


Figure 2 – Origine des macrophages résidents du stade embryonnaire à l'âge adulte à l'état stable.

Les macrophages résidents des tissus peuvent provenir uniquement des macrophages issus du sac vitellin (A, microglie), à la fois des macrophages du sac vitellin et des monocytes du foie fœtal (B, cellules de Langerhans) ou principalement des monocytes du foie fœtal (C, macrophages alvéolaires ; D, cellules de Kupffer). Pour d'autres tissus, les monocytes issus de la moelle osseuse remplacent les précurseurs embryonnaires, selon différentes cinétiques (E, cinétique lente pour le cœur et le pancréas ; F, cinétique rapide pour l'intestin et le derme). Mac : macrophage ; Mo : monocytes (8).

1.1.2. Développement des macrophages et spécialisation tissulaire

1.1.2.1. Monocytes

1.1.2.1.1. Voies de développement des monocytes

Les monocytes sont des cellules mononucléaires dérivées de la moelle osseuse, donnant naissance aux macrophages et aux cellules dendritiques (DC). Ils sont issus de précurseurs myéloïdes au cours de l'hématopoïèse. Ils représentent respectivement 4% et 10% des cellules nucléées dans le sang chez la souris et l'Homme, avec un pool marginal considérable au niveau de la rate pouvant être mobilisé sur demande (15,16).

Dans le modèle classique de l'hématopoïèse, sont produits à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH), des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et des progéniteurs

myéloïdes communs (CMP). Les CLP conduisent à la formation des cellules lymphoïdes, tandis que les CMP à celle des cellules myéloïdes. Ces derniers sont capables de se différencier en progéniteurs de mégacaryocytes/érythrocytes (MEP) d'une part et d'autre part en progéniteurs de granulocytes/monocytes (GMP) (17,18). A partir des GMP, se développent les progéniteurs des monocytes et des DC (MDP) (19). Il a été montré que les MDP produisent des DC via un progéniteur commun de cellules dendritiques (CDP) (20) et des monocytes via un progéniteur monocyte commun (cMoP) chez la souris et chez l'Homme (21,22). Il est ainsi proposé que les monocytes proviennent de ce modèle hiérarchique décrit : CMP → GMP → MDP → cMoP → monocyte (6,17,18) (**Figure 3**).

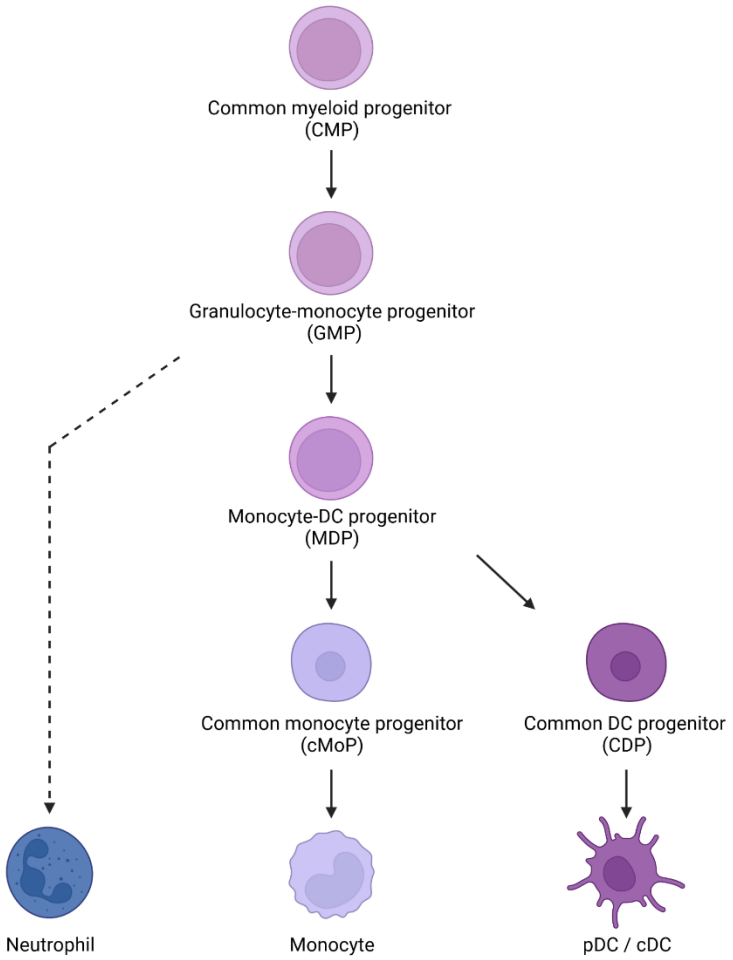


Figure 3 - Voie de développement classique des monocytes.
Le modèle classique du développement monocytaire présente une hiérarchie linéaire. DC : dendritic cells ; pDC : plasmacytoid DC ; cDC : classical DC. Créée avec Biorender.com et adaptée de (18).

Cependant ce modèle a été récemment remis en question. En effet, il a été proposé, chez la souris, que les monocytes émergeraient, non pas d'une seule voie mais de deux voies parallèles, divergeant toutes deux du compartiment CMP. Yanaez et *al*. ont montré que les MDP naissent directement des CMP, indépendamment des GMP, en affirmant ainsi qu'à la fois les MDP et les

GMP peuvent chacun donner naissance à des monocytes par deux voies distinctes (23). Par la suite, les travaux de Liu et *al*. sont venus soutenir l'idée que les monocytes peuvent être générés sans intermédiaire MDP (24). En revanche, ces deux équipes proposent que la voie par laquelle les GMP donnent naissance aux monocytes, implique des progéniteurs différents : soit via un précurseur de monocyte (MP) (23) ou soit via le cMoP (24). Dans l'ensemble, ces travaux démontrent que les monocytes sont probablement générés par deux voies cellulaires distinctes, impliquant des populations progénitrices oligopotentes complémentaires, mais dont la nature reste encore à étudier (23,24) (**Figure 4**).

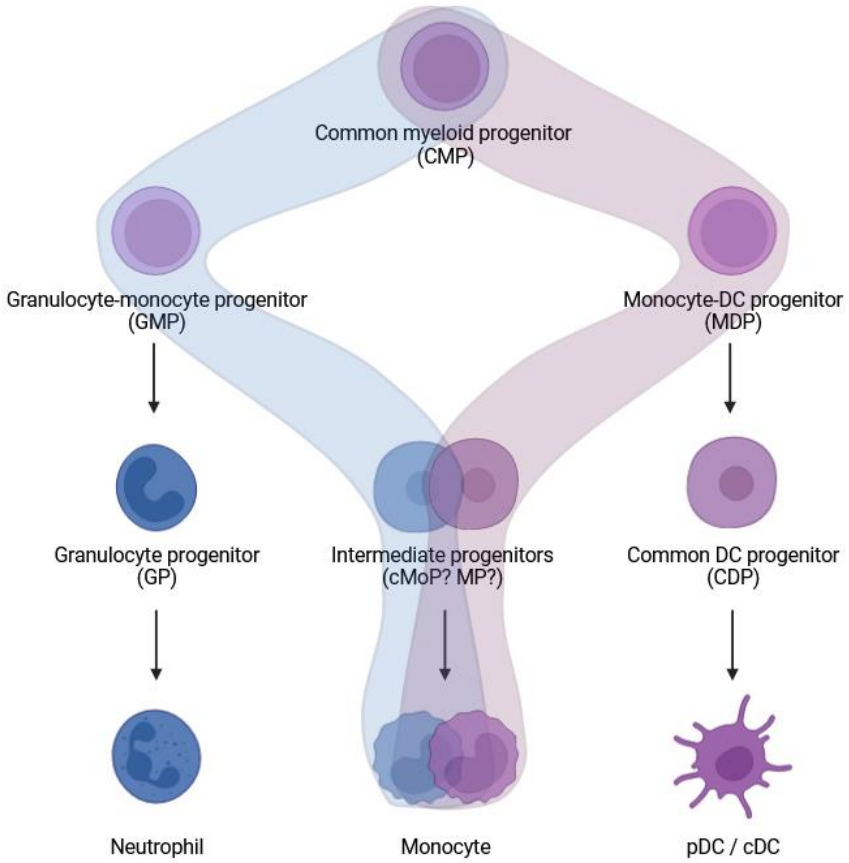


Figure 4 - Voie de développement des monocytes revisitée chez la souris.
Le modèle révisé du développement monocytaire présente une bifurcation majeure au niveau des CMP, aboutissant à deux voies parallèles menant aux monocytes. DC : cellules dendritiques ; pDC : DC plasmacytoïdes ; cDC : DC classiques ; cMoP : progéniteur monocyte commun, MP : précurseur de monocyte. Créée avec Biorender.com.

Ces travaux soulèvent également la question de la nature des monocytes produits par chacune de ces voies. De récentes études ont montré un profil phénotypique identique, avec cependant un profil transcriptionnel qui semble différer et qui reste à être confirmé par d'autres études (23,25). La pertinence de ces monocytes distincts, à l'état physiologique et pathologique peut également être discutée. De premiers résultats suggèrent, en effet, que ces voies de production de monocytes peuvent être mobilisées différemment, selon le pathogène auquel

le système immunitaire est exposé (23).

Enfin, chez l'Homme, Kawamura et *al.*, en plus d'avoir identifié les progéniteurs cMoP humains comme une sous-population de GMP, ont également montré que ces GMP ne produisent pas de cellules dendritiques (22). Ces travaux ont ainsi été les premiers à remettre en question la relation hiérarchique présumée entre les GMP et MDP humains. Récemment, des études RNA-Seq à cellules uniques des monocytes sanguins humains sont venues soutenir l'idée d'une hétérogénéité analogue au sein des monocytes (25–27). Il reste, cependant, à déterminer si des voies de développement parallèles de monocytes similaires à celles observées chez la souris existent chez l'Homme.

1.1.2.1.2. Les différents sous-types de monocytes

L'avènement de la cytométrie en flux a eu un impact sans précédent sur l'immunologie et a permis de mettre en avant l'hétérogénéité des monocytes chez diverses espèces (28).
Chez l'Homme, des populations distinctes de monocytes ont ainsi pu être identifiées par l'expression différentielle des marqueurs CD14 (récepteur du LPS) et CD16 (aussi appelé récepteur Fc gamma III) (29). La combinaison des CD14 et des CD16 sur les cellules HLA-DR+ a permis la classification de trois principaux sous-ensembles de monocytes humains :
- les monocytes $CD14^{+}$ $CD16^{-}$, également appelés monocytes dits « classiques ».
- les monocytes $CD14^{+}CD16^{+}$, dits intermédiaires.
- les monocytes $CD14^{int}CD16^{+}$, dits « non classiques ».
80 à 90% du pool des monocytes est représenté par les monocytes dits « classiques », tandis que les 10 à 20% restants sont partagés entre les monocytes intermédiaires et les monocytes dits « non classiques ».

Chez la souris, la caractérisation des populations distinctes de monocytes s'est faite selon l'expression du récepteur de chimiokine CX3CR1 (30,31). En parallèle, des travaux ont également permis de définir des sous-ensembles de monocytes selon l'expression différentielle des gènes Ly6C (32). Cela a conduit à l'identification de deux sous-ensembles distincts de monocytes :
- les monocytes $Ly6C^{high}CX3CR1^{low}CCR2^{+}CD62L^{+}CD43^{low}$, dits « classiques ».
- les monocytes $Ly6C^{low}CX3CR1^{high}CCR2^{-}CD62^{-}CD43^{high}$, dits « non classiques ».
60% du pool des monocytes est représenté par les monocytes dits « classiques » et 40% par les monocytes dits « non classiques ».

La comparaison transcriptionnelle entre les monocytes murins et humains a permis de corréler les monocytes $Ly6C^{high}$ avec les monocytes $CD14^{+}CD16^{-}$, dits « classiques », et les monocytes $Ly6C^{low}$ avec les monocytes $CD14^{-}CD16^{+}$, dits « non classiques ». (33,34) Certaines différences dans l'expression de gènes ainsi que dans les marqueurs de surface existent tout de même. Pour illustrer ce point, un panel concis de différents marqueurs de surface est ainsi

présenté dans la **Table 1** (33).

		Monocytes humains			Monocytes murins	
		Classiques	**Intermédiaires**	**Non classiques**	**Classiques**	**Non classiques**
Marqueurs monocytaires	CD11b	+	+	+	+	+
	CD11c	+	+	+	/	/
	CD115	+	+	+	+	+
	F4/80	/	/	/	+	+
Marqueurs des sous-ensembles	CD14	++	++	+	/	/
	CD16	-	+	++	-	+
	Ly6C	/	/	/	High	Low
Récepteurs aux chimiokines	CX3CR1	-	+	+	Low	High
	CCR2	+	-	-	+	-
Autres marqueurs de surface	CD62L	+	+	-	+	-
	CD64	-	-	+	/	/
	MHC II	+	++	++	/	/
	CD163	+	+	-	/	/
	CD43	/	/	/	Low	High

Table 1 - Expression monocytaire des marqueurs de surface par espèces et sous-populations.
MHC II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (33).

A l'état stable, il est proposé l'existence d'une séquence de développement entre ces sous-ensembles de monocytes dans la mesure où les monocytes non classiques semblent dériver des monocytes classiques. Des études de traçage de lignées sur la souris ont notamment montré que les monocytes Ly6C^{high} se différencient en monocytes Ly6C^{low} au sein de la moelle osseuse et dans la circulation sanguine (3). Des résultats similaires ont été obtenus avec les monocytes humains circulants (35).

Les monocytes classiques apparaissent ainsi en premier et présentent une demi-vie d'environ 1 jour chez l'Homme et d'environ 20h chez la souris (35,3). Ils sont considérés comme précurseurs des macrophages et des DC. Ils peuvent être mobilisés dans des conditions stables et inflammatoires : l'expression du récepteur CCR2 permet en autre leur recrutement en

réponse à la production de CCL2 (36). Leur recrutement peut également être régulé par l'axe CX3CR1/CX3CL1 (37). Par ailleurs, il a été suggéré la possibilité qu'une partie des monocytes Ly6C^{high}, exprimant fortement le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, soit capable de contribuer au transport d'antigènes aux ganglions lymphatiques, sans aboutir à une différenciation en macrophage ou cellule dendritique. L'étude de ces « monocytes tissulaires » doit être plus approfondie, afin de mieux caractériser leur contribution fonctionnelle (38).

Les monocytes non classiques présentent quant à eux, une demi-vie beaucoup plus longue allant de 4 à 7 jours chez l'Homme et de 2 à 14 jours chez la souris (35,3). Cette longue demi-vie permet de considérer ce sous-ensemble de monocytes plus comme des cellules terminales différenciée que comme de véritables monocytes. De plus en plus de travaux, suggèrent que ces cellules Ly6C^{low} et leurs équivalents humains présentent un rôle dans le maintien de l'intégrité endothéliale (39). Ce rôle est dépendant de l'expression par les cellules endothéliales du ligand CX3CL1, qui se fixe ainsi sur son récepteur CX3CR1 fortement exprimé sur les monocytes non classiques (39). Par ailleurs, ces derniers répondent par l'intermédiaire du récepteur de type Toll (TLR) 7 aux signaux de danger locaux et orchestrent la nécrose des cellules endothéliales par le recrutement de neutrophiles, suivie par la phagocytose *in situ* des débris cellulaires (40).

1.1.2.1.3. Facteurs nécessaires au développement de la lignée monocytaire

Plusieurs facteurs de transcription maintiennent le développement de la lignée monocytaire. La suppression de ces facteurs perturbe la composition des précurseurs monocytaires de la moelle osseuse, entraînant une réduction du nombre de monocytes périphériques. Parmi eux, le facteur de transcription PU.1 y joue un rôle essentiel : son expression élevé antagonise des régulateurs clés d'autres voies de développement, tels que les facteurs de transcription GATA-1, GATA-2 et C/EBPα, et active des facteurs spécifiques à la lignée myéloïde, tels que le facteur de régulation de l'interféron 8 (IRF8), le facteur de type Kruppel 4 (KLF4) (41,42). L'ensemble de ces facteurs de transcription régule l'expression du récepteur CD115 (également connu sous le nom de *macrophage colony stimulating factor receptor* (M-CSFR) ou *colony stimulating factor 1 receptor* (CSF1R)), indispensable pour que les cellules précurseurs monocytaires répondent au M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*, aussi connu sous le nom de *colony stimulating factor 1* (CSF-1)) et se différencient en monocytes. L'expression des molécules d'adhésion (CD11b, CD18, CD14), des récepteurs Fc gamma I (FcγRI), FcγRIIIA, ou encore des récepteurs *éboueurs* de type I et II, nécessaires à la maturation des monocytes, est également régulée par ces facteurs de transcription (41,42). Enfin, certains facteurs sont également spécifiquement impliqués dans la différenciation des sous-ensembles de monocytes, tel que le facteur de transcription NR4A1, essentiel pour la différenciation des monocytes Ly6C^{high} en monocytes Ly6C^{low} (41,42).

En plus du M-CSF, d'autres cytokines interviennent pour le développement des monocytes,

telles que l'interleukine-1 (IL-1), IL-3, IL-6 aux étapes précoces de l'hématopoïèse, ou encore le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, également appelé *colony stimulating factor 2* (CSF-2)) (18).

1.1.2.2. Macrophages dérivés de la moelle osseuse

Les macrophages dérivés de la moelle osseuse sont issus des monocytes « classiques » $LyC6^{high}/CD14^{+}CD16^{-}$. Ils contribuent aux macrophages infiltrants ainsi qu'à une partie des macrophages résidents. Nous nous intéresserons dans ce paragraphe exclusivement aux macrophages infiltrants.

Dans un contexte inflammatoire, les monocytes $Ly6C^{high}/CD14^{+}CD16^{-}$ sont fortement recrutés au niveau du site inflammatoire. Ils se différencient alors soit en macrophages dérivés de monocytes ou soit en DC dérivés de monocytes, sous l'induction du M-CSF et/ou du GM-CSF. L'implication du ligand du récepteur *FMS-related tyrosine kinase 3* (FLT3L) pour la différenciation des DC est discutée (43).

Les macrophages dérivés des monocytes, une fois sur le site inflammatoire, vont répondre aux différents éléments de leur micro-environnement (signaux de stress), qui vont déterminer leur contribution à la réponse inflammatoire locale ou au contraire à sa résolution. Selon la gravité de l'inflammation, ces macrophages dérivés de monocytes s'ajoutent plus ou moins transitoirement au pool de macrophages tissulaires (6). En cas d'inflammation légère, leur nombre se réduit avec la dissipation de l'inflammation. Cependant, dans des contextes d'inflammation plus poussés, ils peuvent persister et s'auto-entretenir une fois qu'ils se sont établis dans le site tissulaire (e.g. athérosclérose (44)).

1.1.2.3. Macrophages résidents tissulaires

Le développement des macrophages résidents des tissus va dépendre de plusieurs facteurs : (i) leur origine et (ii) leur microenvironnement tissulaire.

1.1.2.3.1. Selon leur origine

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les macrophages résidents des tissus se développent selon différentes origines : (i) embryonnaire, issus du sac vitellin ou des monocytes du foie fœtal et (ii) adulte, issus des monocytes dérivés de la moelle osseuse.

Les macrophages dérivés du sac vitellin, aussi appelés macrophages primitifs, possèdent un schéma de différenciation unique, dans le sens où ils ne passent pas par un stade intermédiaire monocytaire. Au contraire des macrophages issus de l'hématopoïèse, le développement des macrophages primitifs est indépendant du facteur de transcription MYB, mais dépend du

facteur de transcription PU.1 (6,45).
Les monocytes issus du foie fœtal, sont issus de l'hématopoïèse définitive, dépendante du facteur de transcription MYB. Leur infiltration dans la plupart des tissus périphériques (exception du système nerveux central), donne naissance à des macrophages résidents (6,45).
Les monocytes dérivés de la moelle osseuse, sont quant à eux issus de l'hématopoïèse définitive à l'âge adulte. Ils dérivent des monocytes circulants Ly6C^{high}/CD14^{+}CD16^{-} et sont associés à une durée de vie courte ou longue avec une capacité de non-renouvellement, contrairement aux macrophages d'origine embryonnaire (45).

Malgré des voies de développement différentes entre les macrophages d'origine embryonnaire ou adulte, à l'état stable au sein d'un même tissu, il existe très peu de différences de fonctions entre ces macrophages. En effet, il a été montré que les macrophages dérivés des monocytes circulants remplaçant les macrophages résidents d'origine embryonnaire (cf. **Figure 2**) adoptent un profil d'expression génique similaire à ces derniers (46–48). Par ailleurs, des expériences d'irradiation ou de déplétion spécifique (pharmacologique ou génétique) de macrophages résidents majoritairement d'origine embryonnaire ont montré que les macrophages dérivés de monocytes colonisent les tissus avec des signatures transcriptionnelles et épigénétiques similaires à celles des macrophages embryonnaires (49,50). Néanmoins, selon le contexte inflammatoire, une différence de fonction selon l'origine des macrophages peut apparaître, notamment dans un contexte tumoral (51), d'inflammation cardiaque (52) ou hépatique (53). Ainsi, avec l'état actuel des connaissances, il est encore difficile d'établir un lien précis entre origine et fonction. Au-delà de l'origine, le contexte tissulaire environnant apparaît comme jouant un rôle important dans l'identité des macrophages, à l'état stable et inflammatoire.

1.1.2.3.2. Selon leur microenvironnement tissulaire

Les macrophages résidents des tissus ne partagent l'expression que de quelques gènes, la majorité de leurs signatures transcriptionnelle et épigénétique étant spécifique au tissu de résidence (48,54), démontrant le rôle important du microenvironnement tissulaire dans le développement des macrophages.

Pour rappel, il existe plusieurs facteurs de transcription spécifiques à la lignée myéloïde (PU.1, IRF8 et KLF-4). Il est également intéressant de noter qu'il existe des facteurs de transcription spécifiques pour la différenciation terminale en macrophage, tels que les facteurs de transcription MAF et MAFB (55). Enfin, plusieurs facteurs de transcription spécifiques aux tissus peuvent également être décrits. Ces derniers sont déclenchés par des signaux spécifiques aux tissus, c'est-à-dire des cytokines ou des métabolites produits localement. Un résumé des différents facteurs de transcription et cytokines spécifiques au développement des macrophages résidents selon leur tissu est présenté dans la **Table 2**.

Sous-ensemble de macrophages	Tissus	Facteurs de transcription spécifiques	Régulation par cytokines/métabolites	Références
Microglie	Cerveau	SMAD2/3, SALL1, IRF8, MEF2C	IL-34, TGF-β	(56), (57), (58), (59), (48)
Macrophages alvéolaires	Poumon	PPARγ, BACH2, C/EBPβ	CSF-2	(60), (61)
Macrophages de la pulpe rouge	Rate	SPIC	CSF-1, hème	(62)
Macrophages de la zone marginal et métallophiles	Rate	LXRα	CSF-1, stérols	(63)
Cellules de Kupffer	Foie	LXRα, SPIC	CSF-1, TGF-β, Notch	(64), (65), (66)
Macrophages intestinaux	Intestin	RUNX3	CSF-1	(48)
Macrophages de la cavité péritonéale	Péritoine	GATA6	CSF-1, acide rétinoïque	(67)
Ostéoclastes	Os	MITF, c-Fos, NF-κB, NFATc1	CSF-1, RANKL	(68), (69), (70)
Macrophages de la moelle osseuse	Moelle osseuse	SPIC	CSF-1, hème	(62)
Cellules de Langherans	Epiderme	ID2, RUNX3	IL-34, TGF-β	(71), (59)

Table 2 - Exemples de macrophages résidents et la spécificité de leur développement.

BACH2 : B lymphoid transcription repressor and CNC homology 2 ; CSF-1 : colony stimulating factor 1 ; CSF-2 : colony stimulating factor 2 ; C/EBPβ : CCAAT/enhancer-binding protein beta ; GATA6 : GATA-binding protein 6 ; ID2 : inhibitor of DNA binding 2 ; IL-34 : interleukine 34 ; IRF8 : Interferon regulatory factor 8 ; LXR-α : liver X receptor-α ; MEF2C : monocyte enhancer factor 2C ; MITF : microphtalmia associated transcription factor ; NFATC1 : nuclear factor-activated T cells 1 ; NF-κB : nuclear-factor-kappa B ; PPARγ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ ; RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ; RUNX3 : runt-related transcription factor 3 ; SALL1 : Sal-like protein 1 ; TGF-β : transforming growth factor beta.

Le développement des macrophages résidents est donc fortement influencé par l'environnement tissulaire (cytokines, métabolites et facteurs de transcription), amenant ces cellules à adopter des fonctions spécifiques, nécessaires à l'homéostasie de son tissu.

Récemment, Guilliams et *al*. ont redéfini les populations de macrophages en intégrant l'importance des interactions des macrophages avec leur environnement. Ils ont ainsi fait émerger le concept de niches de macrophages, en prenant en compte l'origine, la localisation tissulaire et les fonctions associées de ces macrophages (72,73). En fonction des besoins du tissu, la niche elle-même contrôle le développement local des macrophages, selon 3 critères (72) :
- l'accessibilité de la niche (barrière physique),
- la disponibilité de la niche et les facteurs trophiques présents,
- la plasticité des précurseurs présents.

Selon les conditions environnantes du tissu, les besoins des niches tissulaires peuvent varier et influencer le développement et les fonctions des macrophages. Par exemple, dans un modèle de déplétion des cellules de Kupffer, la niche tissulaire sécrète des signaux, permettant le recrutement de macrophages dérivés de monocytes mais également la prolifération des macrophages résidents restants (65). Autre exemple, dans un contexte tumoral, au sein d'un tissu, des signaux spécifiques de la tumeur peuvent moduler les niches tissulaires et ainsi conférer des phénotypes différents aux macrophages peuplant ces différentes niches (74).

Pour conclure, le développement des macrophages peut donc se voir comme un modèle multidimensionnel, se basant sur les signaux auxquels les macrophages sont exposés dans leurs micro-environnements spécifiques (**Figure 5**).

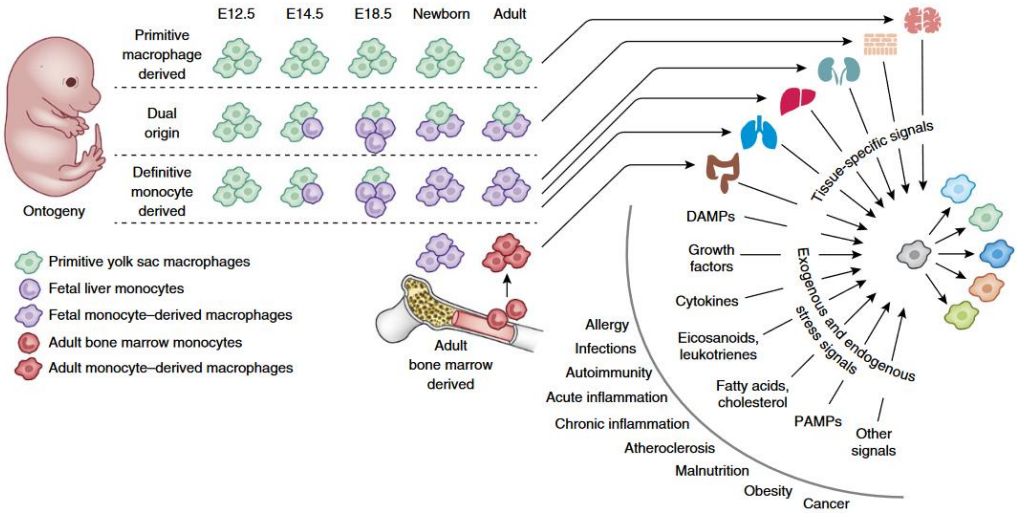


Figure 5 - Modèle multidimensionnel du développement des macrophages.
L'origine, le microenvironnement tissulaire et les signaux de stress influencent le développement des macrophages (75).

1.2. Les activités biologiques des macrophages

Les activités biologiques des macrophages sont régies par l'expression d'une large gamme de récepteurs de surface, endosomale ou encore cytoplasmique, qui vont médier les interactions de ces cellules avec les composants naturels et modifiés de l'hôte ainsi qu'avec une série de micro-organismes. La détection de ces signaux est alors suivie de l'activation de certaines fonctions spécifiques du macrophage, contribuant aussi bien à l'homéostasie qu'à la défense de l'hôte. L'ensemble permet également d'assurer la coordination avec les réponses immunitaires adaptatives.

Dans cette partie, nous nous intéresserons à décrire les principales activités biologiques des macrophages.

1.2.1. La migration

La migration cellulaire est un aspect essentiel à de nombreux processus physiologiques dont le trafic des cellules immunitaires et notamment celui des macrophages et neutrophiles. En effet, ces dernières représentent la première ligne de défense de l'organisme et sont les premières à migrer vers le site inflammatoire en réponse à un gradient de stimuli chimiotactiques (cytokines, protéines du complément ou encore des particules pathogènes), on parle de chimiotactisme ou en réponse à des stimuli mécaniques, on parle de durotaxie (76). Dans cette partie, nous allons nous intéresser spécifiquement à la migration cellulaire dans un contexte de chimiotactisme.

La migration des macrophages joue un rôle important à la fois dans l'homéostasie tissulaire (mobilisation vers les tissus en développement, renouvellement des macrophages résidents) et dans un contexte inflammatoire. Leur mobilisation peut être déclenchée par plusieurs signaux chimiotactiques différents, tels que les cytokines CCL2 ou CX3CL1 lors de la sortie de la moelle osseuse jusqu'à l'extravasion dans les tissus, ou encore dans un contexte inflammatoire, à la suite de la sécrétion de cytokines (CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CXCL10, CXCL12, CX3CL1), la présence de protéines du complément, de particules issues de pathogènes ou encore de signaux issus de cellules nécrotiques (77,78).

Mécaniquement, le processus cellulaire de migration s'explique par la polymérisation du réseau d'actine à l'avant de la cellule, entraînant la formation de protubérances membranaires, appelées lamellipodes. Par la suite, ces lamellipodes sont attachés à la matrice extracellulaire par interaction avec des intégrines, formant ainsi des complexes d'adhésion. Une fois ces complexes établis, le réseau d'actine associé aux fibres de myosine génèrent une force permettant la translocation du corps cellulaire vers l'avant. En parallèle, le détachement de l'attache cellulaire à l'arrière permet d'aboutir à la migration cellulaire (79).

1.2.2. La phagocytose

La phagocytose correspond au processus cellulaire de détection et d'ingestion de particules de plus de 0,5µm de diamètre. Un groupe spécialisé de cellules appelés phagocytes sont capables d'exécuter ce processus, comprenant les macrophages mais également les neutrophiles, les cellules dendritiques ainsi que les monocytes (80). La phagocytose peut avoir lieu en conditions d'homéostasie, pour l'élimination des cellules sénescentes, des débris cellulaires ou des corps apoptotiques, qu'on appelle efferocytose. La phagocytose peut également être un processus de défense immunitaire, par la destruction de cellules infectées ou de micro-organismes.

Différents récepteurs, présents à la surface des macrophages assurent la reconnaissance de ces éléments et initient la phagocytose. D'une part, il y a les récepteurs reconnaissant les signaux de danger : les motifs moléculaires associés aux microbes (MAMPs), aux dégâts (DAMPs), les facteurs environnementaux. Ce sont les récepteurs de reconnaissance de motifs (PRRs), tels que ceux de la famille de récepteurs de lectine de type C tel que le récepteur Dectin-1, les récepteurs du mannose ou encore les récepteurs *éboueurs* (MARCO, CD36) (81,82). D'autre part, il existe les récepteurs opsoniques, reconnaissant les éléments opsonisés, c'est-à-dire marqués par des protéines dérivées de l'hôte, telles que des anticorps ou des protéines du complément. Parmi ces récepteurs, on retrouve les récepteurs des immunoglobulines (récepteur Fcγ) ou encore les récepteurs du complément (83,84). Enfin, les cellules apoptotiques sont reconnues par l'expression de molécules de surface propres à leur état, telles que la phosphatidylsérine, motif majeur d'induction phagocytaire (85). Un résumé de ces récepteurs est présenté en **Figure 6**.

D'autres récepteurs PRRs peuvent être impliqués, tels que les récepteurs TLR. L'activation seule de ces derniers ne permet pas d'induire le processus de phagocytose, cependant leur coopération avec les récepteurs phagocytaires permet de rendre la phagocytose plus efficace (86).

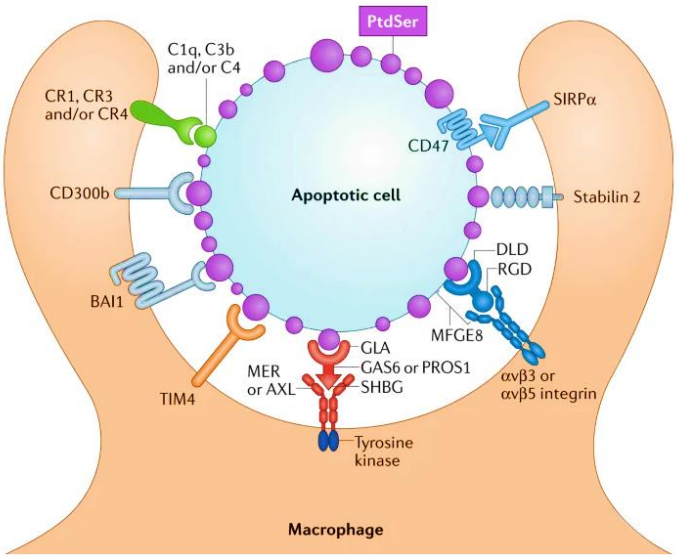


Figure 6 - Exemples de récepteurs à la surface des macrophages initiant la phagocytose d'une cellule apoptotique.
Les cellules apoptotiques présentent à leur surface le motif de phosphatidylsérine, reconnu par les récepteurs BAI1 (brain-specific angiogenesis inhibitor 1), TIM4 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 4), stabilin 2, CD300b. La phosphatidylsérine peut également être reconnue par des protéines solubles (GAS6 ou MFGE8), elles-mêmes reconnues par des récepteurs tyrosine kinase ou des dimères d'intégrine. Les cellules apoptotiques peuvent également être opsonisés et ainsi reconnues par les récepteurs du complément (CR1, CR3, CR4) (87).

Une fois les différents éléments reconnus, les récepteurs phagocytaires déclenchent des voies de signalisation permettant de moduler le réseau d'actine et de lipides membranaires afin d'internaliser les éléments reconnus dans des structures, appelées phagosomes. Il s'en suit une maturation de ces phagosomes, qui va se charger en composants microbicides par des interactions séquentielles avec des vésicules issues de la voie endocytaire (endosome, lysosome). Cela aboutit au développement d'une vésicule destructrice, appelée phagolysosome, contenant des peptides anti-microbiens, des enzymes de digestion et des composés oxygénés et azotés toxiques (88).

Il est à noter, que certaines cellules échappent à la phagocytose par l'expression de signaux « *don't eat me* ». C'est le cas du signal CD47, ligand de la protéine régulatrice du signal-α (SIRP-α), exprimée au niveau des macrophages. La fixation de CD47 sur son récepteur régule négativement les réseaux d'actine, empêchant ainsi la formation de phagosome et *in fine* le process de phagocytose (89).

1.2.3. La présentation de l'antigène

Comme exposé, la phagocytose est une fonction de l'immunité innée, permettant

l'élimination de débris, cellules apoptotiques ou micro-organismes. Dans certains cas, les antigènes peptidiques de ces particules sont conservés afin d'être présentés au système immunitaire adaptif et d'activer notamment la réponse des lymphocytes T. Cette présentation antigénique s'observe également dans des contextes hors phagocytose : la présence d'antigène cytosolique lors d'infection virale ou bactérienne intracellulaire par exemple. Les cellules dendritiques sont les cellules immunitaires les plus reconnues pour cette fonction de présentation antigénique, mais cette fonction a également été décrite pour les macrophages et les lymphocytes B. Ces trois types cellulaires sont appelés cellules présentatrices d'antigène (CPA). (90)

Les peptides antigéniques sont capturés, chargés et présentés dans les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) à la surface de ces cellules. Les CPA ainsi chargées des complexes CMH-peptides migrent vers les organes lymphoïdes secondaires et présentent les antigènes aux lymphocytes T. Les peptides chargées sur les molécules de classe I et II du CMH sont ainsi reconnus et entraînent l'activation des cellules T $CD8^+$ et $CD4^+$ respectivement. De plus, la présence de signaux de co-stimulation, tels que CD80/CD86 interagissant avec le récepteur CD28 lymphocytaire, contribue à renforcer l'activation des cellules T (91).

Les macrophages résidents au niveau de la rate, des ganglions lymphatiques rencontrent constamment des antigènes véhiculés par le sang ou la lymphe, ce qui signifie qu'ils sont idéalement placés pour capter l'antigène (92,93). Ils peuvent ainsi engendrer soit l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ (94) ou soit le transfert de l'antigène aux DC pour une présentation croisée aux T $CD8^+$ (95).

1.2.4. La cytotoxicité induite

Les mécanismes par lesquels les phagocytes tuent les micro-organismes, font appel à de nombreuses fonctions effectrices cytotoxiques, notamment la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

1.2.4.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) constituent un groupe de molécules dérivées de l'oxygène moléculaire, produites à la suite d'un stress oxydatif. Les ROS sont principalement produits sous de multiples formes, notamment l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le peroxyde d'oxygène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH^\bullet$). La production de ces ROS peut être issue de plusieurs sources cellulaires, les deux principales sont constituées par les mitochondries, on parle de ROS mitochondriaux (mtROS), et également par les enzymes cytoplasmiques NADPH oxydases (NOX) génératrices de ROS.

Le rôle des ROS dans la cytotoxicité induite par les macrophages est bien connu. Lors de la

phagocytose de micro-organismes, les macrophages peuvent induire l'expression de la NOX2 au niveau de la membrane plasmique de la cellule ainsi qu'au niveau de la membrane des phagosomes. Une signalisation dépendante des voies TLR et de l'interféron gamma (IFN-γ) induit le recrutement des sous-unités de NOX2 au niveau de ces membranes (96,97). NOX2 est ainsi à l'origine d'une explosion oxydative, par la génération de nombreux ROS, permettant l'élimination des organismes internalisés (98). Outre NOX2, les mtROS peuvent également jouer un rôle dans l'activité cytotoxique des macrophages. Les mécanismes impliqués dans ce rôle des mtROS peuvent impliquer la signalisation des TLRs (99) ou encore l'oxydation des acides gras (100), mais restent à être définis plus clairement. Il est à noter, au niveau des macrophages, qu'au-delà de leur activité antimicrobienne directe, les ROS peuvent également être impliqués dans la régulation de la signalisation immunitaire (101) ainsi que dans l'induction de l'activation de l'inflammasome (102).

1.2.4.2. Les espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote (RNS pour *reactive nitrogen species* en anglais) sont produites à partir du monoxyde d'azote (NO). Ce dernier est métabolisé à partir de L-arginine, par l'action des oxydes nitriques synthases (NOS), exprimées soit de manière constitutive et calcium-dépendant (NOS1 au niveau neuronal et NOS3 au niveau endothélial) ou soit de manière inductible par des signaux cytokiniques (NOS2 ou iNOS au niveau des macrophages). Le NO ainsi formé, réagit rapidement et génère des nitrites (NO_2^-) et également des peroxynitrites ($ONOO^-$) en réaction avec les anions superoxydes (103).

La production de NO est augmentée au niveau des macrophage activés, notamment du fait de l'induction de l'expression d'iNOS. La stimulation des TLRs associés à la signalisation des cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ, TNF-α (*tumor necrosis factor alpha*), IL-1β) va entraîner l'activation des cascades de signalisation conduisant à la transcription d'iNOS, telles que les voies NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) et JAK (*janus kinase)* - STAT (*signal transducers and activators of transcription)* - IRF1 (facteur régulateur de l'interféron 1) (104–106). Il est alors observé la production d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier des $ONOO^-$, exerçant une forte activité antimicrobienne (103). Par ailleurs, au niveau des macrophages, cette production de NO peut entrer en compétition avec la production d'urée/L-ornithine, également métabolisés à partir de la L-arginine par les arginases. Ainsi, les niveaux d'expression d'iNOS, comparés à ceux des arginases peuvent influencer l'activité des macrophages (107).

La **Figure 7** résume les différentes ROS et RNS produites dans les macrophages.

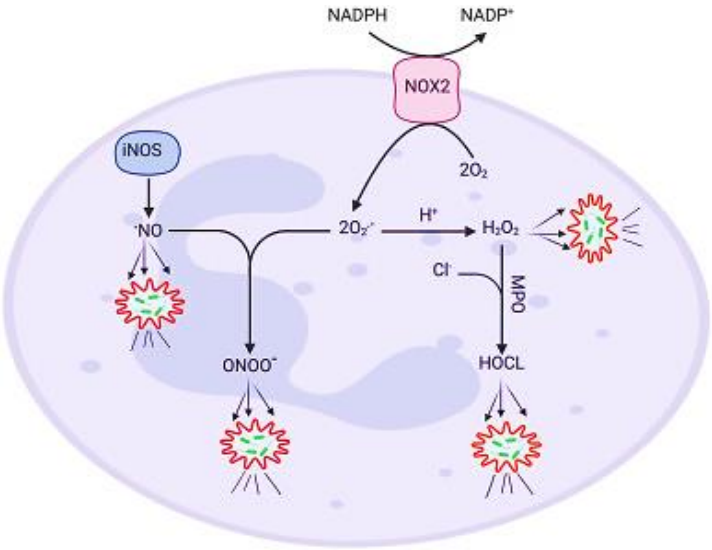


Figure 7 - Génération de ROS et RNS au niveau des macrophages.
Après phagocytose, la NOX2 est activée et génère la production d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), substrat pour la génération d'H_2O_2, lui-même substrat pour la production d'acide hypochloreux (HOCl) par les myélopéroxydases (MPO). L'iNOS génère le NO, qui interagit avec l'$O_2^{\bullet-}$ pour former les peroxynitrites ($ONOO^-$). iNOS : oxyde nitrique synthase inductible ; H_2O_2 : peroxyde d'oxygène ; NO : monoxyde d'azote ; NOX2 : NADPH oxydase 2. Créée avec BioRender.com et adaptée de (103).

1.2.5. La production de cytokines/chimiokines

La production de cytokines et de chimiokines est étroitement liée à la fonction que le macrophage exerce, influencée par son environnement. La sécrétion de ces cytokines et chimiokines par les macrophages, peut avoir des rôles distincts allant de la coordination avec la réponse immunitaire adaptative jusqu'à la modification du panel de cellules recrutées ainsi que leurs fonctions.

1.2.5.1. Cytokines

Les cytokines sont de petites protéines (environ 25kDa), libérées par diverses cellules de l'organisme, en réponse à un stimuli activateur et induisant des réponses en se liant à des récepteurs spécifiques.

Les principales cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages sont le TNF-α, l'IL-1β et l'IL-6.
Le TNF-α est impliqué dans l'induction de la vasodilatation et la perte de perméabilité membranaire. Il est également associé à la sécrétion de molécules d'adhésion et de chimiokines (CXCL1 et CXCL5) au niveau endothélial. L'ensemble permet d'augmenter l'infiltration immunitaire sur le site inflammatoire (108,109).

Les cytokines de la famille de l'IL-1 sont produits sous forme de pro-protéines inactivées, clivées par la suite pour produire les cytokines matures, à l'exception de l'IL-1α, où ses formes pro-protéines et matures sont toutes deux actives. L'IL-1β et IL-18 matures sont produites à la suite de leur clivage par la caspase-1, en réponse à la signalisation TLR et l'activation de l'inflammasome. L'IL-1β, en parallèle du TNF-α, joue un rôle dans l'adhérence des cellules à l'endothélium vasculaire (110). Sa sécrétion favorise l'expansion et la différenciation des lymphocytes T CD4 (111). L'IL-18 est impliquée dans la production d'IFN-γ ainsi que dans l'activation des cellules *natural killer* (NK) et des lymphocytes T CD4 en cellules Th1 (112).
L'IL-6 sécrétée permet le recrutement de monocytes sur le site inflammatoire et influence l'activation des cellules T, dans la phase aiguë de l'inflammation (113).
D'autres cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages peuvent être citées, telles que l'IL-12 agissant en synergie avec l'IL-18 pour la production d'IFN-γ et l'activation des cellules T (114,115) ; l'IL-23, également un inducteur d'IFN-γ et un activateur de cellules T (116).

Les principales cytokines anti-inflammatoires sécrétées par les macrophages sont l'IL-10, le TGF-β (*transforming growth factor beta*).
L'IL-10 agit principalement en inhibant l'activation des macrophages (induite par IFN-γ ou le lipopolysaccharide (LPS)), notamment sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) (117), son activité microbicide (118) ainsi que sur l'induction d'expression d'iNOS et des NADPH oxydases (119,120). La sécrétion d'IL-10 est également impliquée dans l'inhibition de la présentation de l'antigène aux cellules T, par son effet inhibiteur sur l'expression des molécules CMH de classe II (CMH-II) (121).
Le TGF-β joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation, notamment en cas d'inflammation excessive. En coordination avec l'IL-10, il inhibe également les effets inflammatoires des cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'expression des molécules de CMH-II. Il joue un rôle dans le maintien des lymphocytes T régulateurs, ayant un rôle immunosuppresseur (122).
D'autres cytokines anti-inflammatoires sécrétées par les macrophages peuvent être citées, telles que l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL1-Ra), inhibiteur spécifique de l'activation cellulaire médiée par l'IL-1α et l'IL-1β (123) ; ou encore l'IL-6 qui peut également exercer des propriétés anti-inflammatoires, en régulant les niveaux de TNF-α et IL-1 (124).

Enfin, les macrophages peuvent également être à l'origine de la sécrétion d'IFNα-β, notamment à la suite d'une infection virale. Ces IFN de type I peuvent également être considérés comme des médiateurs importants des réponses anti-inflammatoires (125,126).

1.2.5.2. Chimiokines

Les chimiokines constituent une famille de cytokines chimioattractantes, qui induisent la migration des cellules réactives voisines. Leur action est médiée via l'activation des récepteurs aux chimiokines, présents à la surface des cellules immunitaires.

Brièvement, les macrophages peuvent sécréter différents types de chimiokines, recrutant ainsi divers acteurs cellulaires influençant la réponse immunitaire. Par exemple, selon leur profil de chimiokines, ils peuvent être à l'origine du recrutement de lymphocytes Th1 ou de lymphocytes Th2. Ils peuvent également être à l'origine du recrutement de cellules immunitaires favorisant la réponse inflammatoire, telles que les neutrophiles ou les cellules NK, ou au contraire recruter des cellules immunitaires régulant négativement cette réponse inflammatoire, telles que les lymphocytes T régulateurs (127).

Pour conclure, les macrophages présentent un large éventail de fonctions biologiques, qui permettent en autres à ces cellules immunitaires d'aussi bien endosser un rôle de défense pro-inflammatoire tout comme un rôle de maintien homéostatique anti-inflammatoire.

1.3. L'activation des macrophages

La capacité des macrophages à adopter des fonctions distinctes s'explique par la plasticité fonctionnelle de ces cellules, à moduler leur état d'activation selon leur micro-environnement, notamment en fonction de la niche tissulaire, des cellules environnantes, des chimiokines et cytokines sécrétées. Ces différents états d'activation des macrophages, que l'on peut également appelés polarisation des macrophages, ont connu ces dernières années une redéfinition de leur nomenclature. Avant de vous introduire celle-ci, il est nécessaire de s'intéresser tout d'abord à la nomenclature classique de ces états d'activation, notamment afin de mieux comprendre les biais qui ont permis sa remise en question.

1.3.1. Nomenclature classique

Initialement deux grands états d'activation des macrophages ont été décrits, notamment selon le schéma de polarisation des lymphocytes T helper (Th1/Th2) (128). Premièrement, les **macrophages de type M1**, également appelés macrophage « d'activation classique », participant aux réponses de type Th1. Ils jouent un rôle plutôt pro-inflammatoire et ont des propriétés anti-tumorales. Ils peuvent être activés par l'IFN-γ, ou par la signalisation des TLRs. Dans ces conditions, une augmentation des facteurs de transcription NF-κB, STAT1 et IRF5 est observée et mène à une production élevée de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α), ainsi que la génération de ROS et de RNS, notamment par l'augmentation d'expression des NOX et d'iNOS et un niveau élevé d'expression des CMH-II. Ces macrophages sont ainsi dotés d'une forte activité cytotoxique, leur permettant d'éliminer pathogènes et cellules endommagées (127,129).

Deuxièmement, les **macrophages de type M2**, également appelés macrophage « d'activation alternative ». Ils participent aux réponses de type Th2, notamment à la résolution de l'inflammation, la régulation immunitaire, l'angiogenèse et la progression tumorale, jouant ainsi un rôle plutôt anti-inflammatoire. Ils peuvent être activés par des signaux variés et ainsi

se caractériser par des fonctions différentes, ce qui a permis de définir différentes sous-populations de macrophages de type M2 (127,129).
Les macrophages M2a se différencient en réponse à l'IL-4 et l'IL-13, notamment via le facteur de transcription STAT6. Les facteurs de transcription IRF4 et PPARγ sont également impliqués. Ce type de macrophage est associé dans les processus de réparation tissulaire (127,129).
Les macrophages M2b, quant à eux, sont générés par l'exposition combinée à des complexes immuns et à des agonistes TLR ou l'IL-1β. Ils conservent des niveaux élevés de production de cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF-α), avec en parallèle des niveaux élevés d'IL-10 et faibles d'IL-12. Ils favorisent la différenciation Th2 et la production d'anticorps humoraux (127,129).
Les macrophages M2c sont activés par l'IL-10, le TGF-β et les glucocorticoïdes. L'IL-10 se lie à son récepteur et entraîne son auto-phosphorylation, ce qui active le facteur de transcription STAT3. La liaison de STAT3 à son promoteur inhibe les voies de signalisation des cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages M2c jouent un rôle dans la réparation tissulaire, par la sécrétion de composants de la matrice (127,129).
Les macrophages M2d, définis plus tardivement, sont induits par les agonistes TLR par l'intermédiaire du récepteur de l'adénosine. La signalisation induite supprime la production de cytokines pro-inflammatoires et induit la sécrétion d'IL-10 ainsi que celle du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Les macrophages M2d se caractérisent ainsi par des propriétés pro-angiogéniques (130).

La plasticité fonctionnelle des macrophages leur permet de passer rapidement d'un phénotype M1 à M2 ou M2 à M1, selon des signaux spécifiques reçus de leur environnement. Par exemple, les macrophages polarisés M2 peuvent être reprogrammée vers un phénotype M1, en réponse à une stimulation par l'IFN-γ (131). De, même le LPS peut également conduire à ce changement phénotypique de M2 vers M1 (132).

1.3.2. Nomenclature revisitée

Comme vu précédemment, l'environnement tissulaire du macrophage joue un grand rôle dans son développement (cf. partie 1.2) et l'acquisition de ses fonctions. Cette classification binaire M1/M2 de l'activation des macrophages semble ainsi trop simpliste, afin d'illustrer l'influence de l'environnement. Par exemple, il a été montré que selon si l'activation M1 est induite par l'IFN-γ ou par la signalisation des TLRs, un profil d'expression protéomique différent est adopté par le macrophage (133). De plus, ces phénotypes M1/M2 semblent bien plus complexes, puisqu'un macrophage de type M1 peut être associé à des propriétés de réparation tissulaire ou d'immunorégulation ; et inversement un macrophage de type M2 peut être impliqué dans des rôles pro-inflammatoires (134). Dans ce sens, ces dernières années, une remise en question de cette nomenclature classique des macrophages a été effectuée, en mettant en avant l'existence d'une grande diversité d'états d'activation des macrophages, à l'image de la diversité que peut représenter l'environnement tissulaire. Les phénotypes M1 et M2 sont ainsi plus considérés comme deux extrêmes d'un continuum d'états d'activation

multiples des macrophages.

Récemment, plusieurs experts de la biologie du macrophage ont proposé différentes directives afin de décrire l'activation des macrophages de manière plus globale, basées sur trois principes : l'origine/environnement des macrophages, la nature du stimulus activateur et un ensemble de marqueurs d'activation (135) (**Figure 8**). D'autres chercheurs ont tenté de définir de grandes voies d'activation des macrophages selon les espèces et les pathologies (136,137). Dans l'ensemble, l'activation des macrophages doit être abordée non pas comme restrictive à deux états, mais en prenant en compte plusieurs critères (stimuli activateur, marqueurs d'activation) et notamment les fonctions exercées.

Dans la suite de notre argumentation ainsi que dans nos travaux de thèse, nous nous efforcerons d'évoquer l'activation des macrophages selon ce nouveau point de vue, en prenant en compte les fonctions du macrophage si elles sont connues, sinon le stimulus activateur.

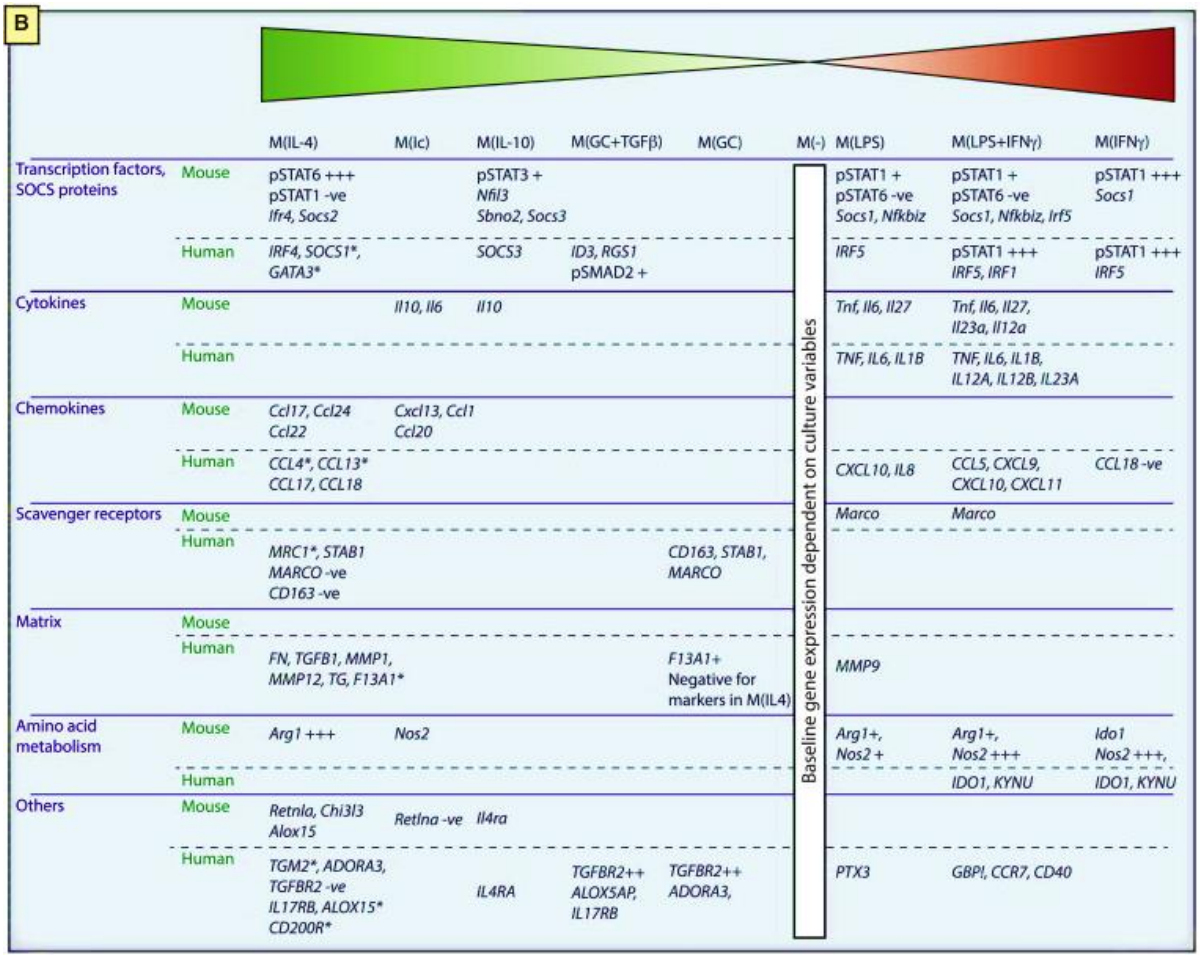


Figure 8 - Directives proposées pour décrire l'activation des macrophages (135).

1.3.3. Les principales voies de régulation de l'activation des macrophages

Les macrophages présentent une dynamique et une plasticité fonctionnelle, qui peuvent moduler leur état d'activation selon leur microenvironnement. Plusieurs facteurs distincts spécifiques peuvent être nécessaires à la régulation de ces états d'activation des macrophages dans des contextes correspondants. Nous allons résumer ci-dessous les principaux facteurs de transcription, facteurs immunométaboliques et facteurs épigénétiques, impliqués dans cette régulation.

1.3.3.1. Les facteurs de transcription

1.3.3.1.1. Les facteurs transducteurs de signaux et activateurs de transcription

Les facteurs de transcription STAT (*signal transducers and activators of transcription* en anglais) correspondent à une famille de facteurs de transcription, dont l'activation dépend d'une famille de molécules de transduction de signal, appelée les tyrosines kinases JAK (pour *Janus kinase*). Ces JAK interagissent avec les domaines intracellulaires des récepteurs à activité tyrosine kinase, tels que les récepteurs de l'IFN. La liaison du ligand sur son récepteur va induire la dimérisation de ce dernier ainsi que l'activation de JAK. Cela entraîne la phosphorylation du récepteur lié, conduisant à la formation d'un site d'ancrage pour les STAT. Au niveau de ce site d'ancrage, JAK phosphoryle STAT, qui se dissocie ainsi du récepteur et migre vers le noyau pour se lier à des promoteurs de gènes cibles et régule la transcription de ces gènes cibles (138). Le rôle de ces voies de signalisation JAK/STAT dans la régulation de la polarisation des macrophages est bien connu. D'une part, en réponse à l'IFN-γ, l'implication de la voie JAK1/2 et STAT1 contrôle l'expression de plusieurs gènes importants dans la réponse inflammatoire, tels qu'en autres l'iNOS, les molécules du CMH II et l'IL-12 (139). D'autre part, les cytokines IL-4 et IL-13 sont également connues pour activer le facteur de transcription STAT6 et ainsi moduler l'expression de l'arginase-1, du récepteur du mannose (également connu sous le nom de CD206), ou encore des gènes tels que Fizz1 (Retnla pour *resistin-like-α*) ou Ym1 (Chi3l3 pour *chitinase 3-like 3*). L'ensemble induisant le macrophage à adopter des fonctions plutôt anti-inflammatoires (140,141). Enfin, dans ce même sens, l'IL-10 active le facteur de transcription STAT3 et permet d'induire l'expression de TGF-β et de CD206 (142). De plus, il est à noter qu'un antagonisme bien établi entre STAT1 et STAT6 a été décrit, concernant la polarisation des macrophages induite par l'IFN-γ et l'IL-4 respectivement (143).

Enfin, les voies de signalisation induites par ces voies JAK/STAT peuvent être régulées négativement par les protéines de la famille des suppresseurs de la signalisation des cytokines (SOCS, pour *suppressors of cytokines signalling*) (144).

1.3.3.1.2. Les facteurs régulateurs de l'interféron (IRFs)

Les facteurs de transcription IRFs modulent la transcription des interférons et jouent un rôle essentiel dans diverses réactions immunitaires. Ils sont composés de 9 membres (IRF1 à IRF9),

dont uniquement 6 sont impliqués dans la régulation de l'activation des macrophages (IRF1 à 5 et IRF8) (145).

Ils peuvent, d'une part, jouer un rôle dans l'acquisition de fonctions inflammatoires du macrophage, comme c'est le cas pour IRF3. La signalisation des récepteurs TLRs, implique les protéines médiatrices Myd88 et TRIF, et mène à l'activation d'IRF3 via la voie TRIF, ce qui conduit à la sécrétion d'IFN, tels que l'IFN-α et IFN-β (146). L'activation d'IRF3 peut également faire suite à l'activation du stimulateur des gènes de l'interféron (STING), lors de sa liaison au capteur d'ADN cytosolique cGAS, qui conduit au recrutement de la kinase TBK1 et permet l'activation de la phosphorylation d'IRF3 (147). Ces IFN une fois sécrétés vont activer le facteur de transcription STAT1, comme vu précédemment, et induire l'expression de gènes pro-inflammatoires.

Le facteur de transcription IRF5, quant à lui, peut être induit en réponse à la stimulation de plusieurs PRRs. Il peut notamment être activé par la signalisation des TLR7 et TLR8. Schoenemeyer et *al*. ont ainsi démontré que MyD88 ainsi que la kinase associée au récepteur de l'interleukine 1 (IRAK1) et le facteur 6 associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TRAF6) sont nécessaires à l'activation de IRF5 dans la voie de signalisation TLR7 (148). L'activation d'IRF5 est suivie par sa dimérisation, sa translocation au niveau nucléaire et son activité transcriptionnelle. En aval, son activation dans cette voie de signalisation-dépendante des TLRs est impliquée dans l'induction génétique de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, l'IL-12 et le TNF-α (149). L'activation d'IRF5 est également associée à la répression de l'expression de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 (150). La modulation de l'expression d'IRF5 peut orienter le macrophage vers la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires vs anti-inflammatoires, soulignant un rôle d'IRF5 dans la polarisation des macrophages (150). Il est à noter que des mutations gains de fonction au niveau du gène IRF5 existent et augmentent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, médiée par les PRRs (151). Il a été montré que ces mutations prédisposent à des maladies auto-immunes, telles que le lupus érythémateux (152,153). Enfin, IRF5 peut lui-même être régulé par le corépresseur transcriptionnel TRIM28, afin d'éviter la sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires. Ce mécanisme passe principalement par le recrutement, par TRIM28, de complexes impliqués dans l'extinction de gènes, tels que les histones désacétylases et des méthyltransférases. Il a notamment été montré qu'IRF5 forme un complexe avec la méthyltransférase SETDB1, dont l'activité passe par la triméthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me3) (154). Il s'agit d'une modification conservée des histones, qui peut être déposée à certains loci et joué un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes. Il a été montré que l'extinction de TRIM28 dans les macrophages humains augmente l'expression du TNF-α, qui peut être expliquée par la réduction du dépôt de H3K9me3 au niveau du locus TNF-α humain (154).

D'autre part, les facteurs de transcription IRFs peuvent également jouer un rôle dans l'acquisition de fonctions homéostatiques du macrophage. IRF4, notamment, est un régulateur négatif de la signalisation TLR. En effet, IRF4 est connu pour inhiber l'activation d'IRF5, en entrant en compétition pour l'interaction avec la protéine adaptatrice Myd88 (155). Il a été

démontré que l'histone déméthylase JMJD3 (*Jumonji domain-containing-3*), élimine la méthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27), libérant ainsi l'expression d'un certain nombre de gène, dont *Irf4*. Il est également intéressant de noter qu'IRF4 peut être à l'origine de l'induction d'une signalisation dépendante de STAT6, pouvant réguler JMJD3. Ainsi, IRF4 et JMDJ3 régulent réciproquement l'expression de l'un et de l'autre. Il a été montré l'importance de JMJD3 dans la polarisation des macrophages induite par l'IL-4, impliquant ainsi également IRF4 dans ce mécanisme de polarisation (156).

1.3.3.1.3. Le facteur nucléaire NF-κB

Le facteur NF-κB orchestre les réponses immunitaires inflammatoires en réponse à divers stimuli. Le système NF-κB se compose de plusieurs membres : RelA (p65), RelB, NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2(p100/p52) et c-Rel. Chaque membre, à l'exception de RelB, peut former des homodimères ainsi que des hétérodimères entre eux. A l'état d'équilibre, les complexes NF-κB se composent de ces homodimères/hétérodimères, associés avec les protéines inhibitrices de NF-κB (IkB) dans le cytosol. En réponse à des stimuli, tels que des PAMPs ou des cytokines, IkB est phosphorylé par la kinase de l'IkB (IKK) et conduit à la translocation du complexe NF-κB dans le noyau, où il se lie au promoteur des gènes cibles (157). Selon les différentes compositions d'homo- et d'hétérodimérisation, une régulation différentielle des gènes cibles est associée. Par exemple, il a été montré qu'à la suite de l'activation du TLR4 par le LPS, le complexe p65 de NF-κB permet l'expression des cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-12 (158). Au contraire, les homodimères p50 et p52 agissent plutôt comme des répresseurs et régulent négativement l'expression de ces cytokines (159). L'accumulation d'homodimères p50 a notamment été observée dans les macrophages tolérants à l'endotoxine (160), ainsi que dans les macrophages associés aux tumeurs (161). Cela suggère bien le rôle essentiel de modulateur transcriptionnel de NF-κB dans la polarisation des macrophages.

1.3.3.1.4. L'axe CREB-C/EBPβ

Les protéines C/EBP (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein*) sont des facteurs de transcription bZIP (*basic region leucine zipper* en anglais). Comme évoqué dans la partie 1.1.2., ce sont des facteurs de transcription impliqués dans le développement des monocytes/macrophages, mais leur rôle dans l'activation des macrophages a également été décrit. Il a été montré que le facteur C/EBPβ régule spécifiquement l'expression des gènes codant pour l'arginase-1, l'IL-10 et CD206 à la suite de la stimulation des TLRs, lorsque son expression est induite par la protéine de liaison de l'élément répondant à l'adénosine monophosphate cyclique (CREB) (162). Cette activité CREB-C/EBPβ a été décrite *in vivo* comme cruciale pour la fonction de réparation tissulaire des macrophages (163). Le facteur C/EBP a également été décrit comme jouant un rôle dans l'activation des macrophages, afin d'orienter les fonctions du macrophage vers un maintien du métabolisme énergétique (164).

1.3.3.1.5. Les récepteurs nucléaires PPAR

Les PPAR (*peroxysome proliferator-activated receptors* en anglais) appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires d'hormones et sont composés de trois membres : PPARα, PPARγ et PPARβ/δ. Ils ont, tous les trois, été associés à des fonctions de régulation de l'activation des macrophages. Les récepteurs PPARα, à la suite de son activation, influence négativement les facteurs de transcription NF-κB et inhibe ainsi l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF-α et l'IL-1β (165) tout en induisant l'expression de l'arginase-1, du TGF-β et CD206 (166). Par ailleurs, des travaux ont montré que les souris déficientes en PPARα présentent une inflammation prolongée, à la suite de la stimulation pro-inflammatoire par le leucotriène B4 (167). Les récepteurs PPARγ module les activités des facteurs de transcription STAT et NF-κB. D'une part, PPARγ agit comme un complexe répresseur, inhibant la transactivation de NF-κB sur le promoteur des gènes cibles (168). D'autre part, l'expression de PPARγ peut être induite par l'IL-4 et l'IL-13. Dans ce cas précis, il a été identifié comme une cible directe en aval de STAT6, régulant positivement les gènes cibles associés (169). Enfin, les récepteurs PPARβ/δ sont également induits par l'activation de STAT6 (170).

1.3.3.1.6. Les facteurs de type Krüppel (KLF)

Les KLF appartiennent à une sous-famille de la classe des facteurs de transcription à doigts de zinc, se liant à l'ADN. Actuellement, 18 KLF ont identifiés, exprimés dans la plupart des tissus et impliqués dans divers processus cellulaires, dont l'activation des macrophages (171). Par exemple, KLF2 et KLF3 inhibent le processus transcriptionnel induit par NF-κB, notamment l'accessibilité sur les promoteurs des gènes cibles. Des travaux démontrent que les macrophages des souris déficientes pour KFL2 sont sensibles à la réponse inflammatoire et présentent une meilleure clairance des pathogènes dans un modèle de péritonite bactérienne (172). Dans ce même sens, KLF3 a été décrit comme un suppresseur de l'inflammation, en réprimant l'activité du dimère p65 de NF-κB et la production de cytokines pro-inflammatoires en aval (173). Au contraire, KLF6 est nécessaire pour une liaison optimale du dimère p65 aux promoteurs des gènes cibles et a une action inhibitrice sur PPARγ (174). Enfin, KLF4 agit en synergie avec le facteur de transcription STAT6 et conduit à la sécrétion en aval de cytokines anti-inflammatoires (175).

1.3.3.2. Les facteurs immunométaboliques

L'activation des macrophages impacte leur activité métabolique. Selon leur état d'activation, les macrophages adoptent des activités métaboliques distinctes, principalement dictées par les mitochondries. Les nombreux processus qui se déroulent dans les mitochondries sont intimement liés à leur morphologie et leur dynamisme. Un large éventail d'acteurs cellulaires est connu pour agir sur ce métabolisme cellulaire, reflétant ainsi le grand nombre de potentiels facteurs pouvant moduler l'activation des macrophages d'un point de vue métabolique et qui

mériterait une argumentation détaillée. Dans cette sous-partie, pour un souci d'exhaustivité et toujours dans le but d'introduire nos travaux de thèse, nous allons principalement nous focaliser sur l'impact de la dynamique des mitochondries sur l'activation des macrophages.

1.3.3.2.1. Généralités sur la dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale correspond à l'équilibre entre les cycles répétitifs de fusion et fission des mitochondries (176). Ces dernières années, ce processus a été particulièrement étudié et montré comme essentiel pour assurer la ségrégation de l'acide désoxyribonucléique mitochondrial (ADNmt), la régulation des niveaux de mtROS, l'homéostasie calcique et la phosphorylation oxydative (177).

La fusion mitochondriale nécessite trois protéines GTPases transmembranaires, apparentées à la dynamine, qui sont soit ancrées au niveau de la membrane externe mitochondriale, ce sont les mitofusines 1 et 2 (MFN1/MFN2), ou soit ancrée au niveau de la membrane interne, c'est le cas de la protéine 1 de l'atrophie optique (OPA1). Le processus de fusion a lieu en deux étapes : les mitofusines interviennent lors de la première étape, en formant des complexes homo-oligomériques et hétéro-oligomériques et permettant la fusion des membranes externes de deux mitochondries adjacentes. La seconde étape fait intervenir la protéine OPA1 pour la fusion des membranes internes (178,179) (**Figure 9**).

La fission mitochondriale est permise par deux classes de molécules. L'acteur central est représenté par la GTPase protéine 1 apparentée à la dynamine (DRP1), qui s'assemble sur les tubules mitochondriaux en des points spécifiques (178,179). Ces sites sont pré-marqués par le réticulum endoplasmique et l'actine, permettant à la protéine DRP1 de s'assembler en spirales, qui peuvent mener à la scission de la mitochondrie (180,181) (**Figure 9**). DRP1 étant majoritairement présent au niveau du cytosol, une deuxième classe de molécules est nécessaire pour recruter efficacement DRP1 au niveau mitochondrial. Il s'agit de protéines présentes à la surface mitochondriale, telles que les protéines de fission mitochondriale 1 (Fis1), le facteur de fission mitochondriale (Mff), la protéine du dynamisme mitochondriale de 49kDa (MiD49) et la protéine du dynamisme mitochondriale de 51kDa (MiD51) (178,179). La fonction de DRP1 peut être régulée par de multiples modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, notamment au niveau de deux sérines clés. La phosphorylation de la sérine 616 (S616), par la kinase dépendante des cyclines 1 (Cdk1)/cycline B pendant la mitose, augmente l'activité de DRP1. A l'inverse la phosphorylation de la sérine 637 (S637) par la protéine kinase A (PKA) mène à l'inhibition de l'activité de la fission. Cependant, une augmentation intracellulaire de calcium peut aussi entraîner la phosphorylation de S637 par la protéine kinase α dépendante du calcium et de la calmoduline (CaMKIα) et activer la fission mitochondriale (182). Ces différents effets de la phosphorylation de S637 sont à prendre dans leur ensemble, selon le contexte cellulaire : l'augmentation du calcium intracellulaire ayant, par un exemple, de multiples autres cibles et effets cellulaires possibles, qui peuvent influencer la dynamique des mitochondries.

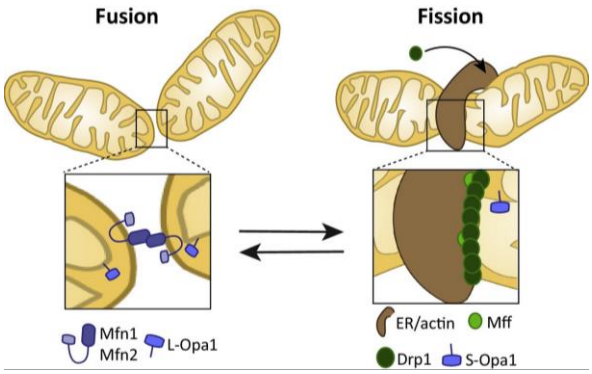


Figure 9 - Régulation de la fusion et la fission mitochondriale (183).

L'équilibre entre ces deux processus de fusion et fission est une fonction essentielle chez les mammifères, qui si altérée peut entraîner la dysfonction de nombreuses fonctions cellulaires (morphologie mitochondriale, capacité respiratoire, stabilité de l'ADN mitochondrial, l'apoptose et la réponse au stress cellulaire). Lorsque cet équilibre est modifié ou rompu, des changements caractéristiques peuvent être observés au niveau de la morphologie globale des mitochondries, notamment au niveau de la forme et la taille mitochondriale (**Figure 10**) (184).

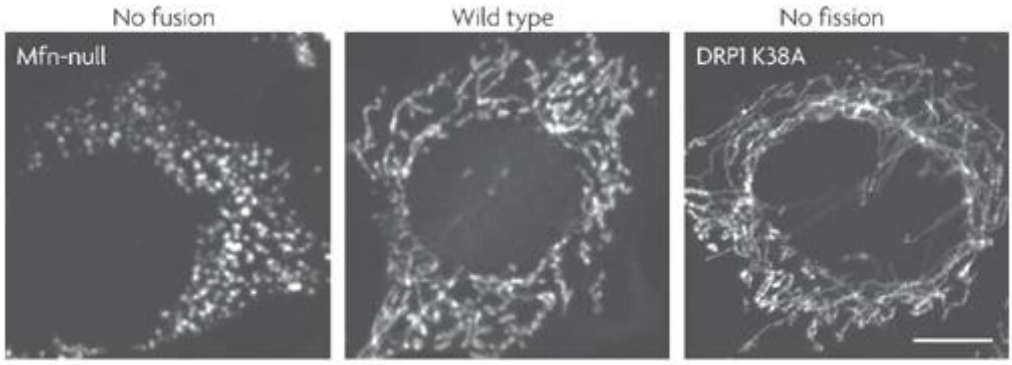


Figure 10 - Différences de morphologie mitochondriale entre fusion et fission
Dans les cellules de type sauvage (au centre), les mitochondries présentent des microtubules de longueur variable. En l'absence des mitofusines (à gauche), la fusion n'étant plus permise, les mitochondries sont fragmentées (ponctiformes). Enfin, à l'inverse une diminution de la fission induite par une altération inhibitrice de la protéine DRP1 (à droite), se traduit par des mitochondries allongées. La barre d'échelle représente 10µm (184).

1.3.3.2.2. La dynamique mitochondriale module l'activation des macrophages

Dans plusieurs cellules immunitaires, telles que les cellules T et les macrophages, il a été démontré que les mitochondries adoptent des morphologies mitochondriales spécifiques en fonction de l'état d'activation cellulaire (185,186). De ce fait, la modulation des protéines régulant la dynamique mitochondriale peut avoir un effet sur l'activation de ces cellules. D'une part concernant la fusion mitochondriale et spécifiquement la protéine MFN2, il a été montré

que l'activation des macrophages dépendante du LPS induit son expression. La déplétion de celle-ci altère la réponse à l'inflammation, notamment la production de ROS, l'induction de cytokines et de NO. La déficience de MFN2 est ainsi associée à un dysfonctionnement de l'autophagie, de l'apoptose, de la phagocytose et de la présentation de l'antigène. Cela a été montré après activation des macrophages par LPS, mais également après infection par *Listeria* ou *Mycobacterium tuberculosis* (187,188). De manière intéressante, une étude menée par Khodzhaeva et *al*. a démontré un rôle opposé de MFN2 dans la réponse inflammatoire des macrophages. En effet, ils ont mis en avant le rôle pro-inflammatoire de la déplétion de MFN2 dans les macrophages humains activés par le zymosan avec la potentialisation de l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-8 et TNF-α). De plus, ils ont révélé que l'inhibition de MFN2 amplifie la réponse dépendante de la signalisation TLR2 activés par le zymosan, notamment en agissant en amont sur la voie NF-κB (189). Dans l'ensemble, MFN2 est impliqué dans la réponse des macrophages et son rôle exact dans l'activation des macrophages semble dépendre du contexte d'activation et reste à être étudié de manière plus approfondie.

D'autre part, la protéine DRP1 a également été associée à la modulation de l'activation des macrophages. Une première étude a montré que les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse, activés par le LPS, présentent un nombre élevé de mitochondries, expliqué par un enrichissement de la protéine DRP1, permettant la fission mitochondriale. Ce recrutement de DRP1 par le LPS est associé à une augmentation de sa phosphorylation sur la sérine 635 (équivalent murin de la phosphorylation de la sérine 616 humaine), dépendante de la signalisation TLR4-Myd88 (190). Par la suite, une autre équipe a montré l'expression du facteur de transcription STAT2, permettant d'amplifier la phosphorylation de DRP1 S616, après activation des macrophages par LPS. Dans ce contexte, ils ont observé un remodelage des mitochondries associée à une hausse de production de ROS, entraînant la transcription de cytokines pro-inflammatoires dépendante de NF-κB. L'inhibition pharmacologique ou génétique de DRP1 a permis d'inhiber l'activation des macrophages induite par le LPS (191). Dans ce sens, Gao et *al*. ont souligné le rôle clé de DRP1 dans la réponse pro-inflammatoire des macrophages et notamment son implication dans le contrôle post-transcriptionnel de la production de TNF-α (192). Enfin, une dernière étude plus récente a montré que les cellules de Kupffer traitées par LPS libèrent de l'ADNmt, à la suite de la génération de mtROS dépendante de DRP1, l'ensemble permettant l'activation de la voie de signalisation du stimulateur des gènes de l'interféron (STING). Il s'en suit alors la phosphorylation d'IRF3 et de NF-κB, qui se déplacent vers le noyau et induisent la transcription de gènes pro-inflammatoires. De plus, cette même étude a montré que l'inhibition pharmacologique de DRP1 atténue l'activation de STING, induite par le LPS dans les cellules de Kupffer et *in fine* protège la fonction hépatique (193). La fission mitochondriale dépendante de DRP1 semble ainsi nécessaire à la différenciation des macrophages après stimulation par le LPS.

1.3.3.3. Les facteurs épigénétiques

L'épigénétique contrôle l'expression des informations codées dans l'ADN, sans modification du code génétique. Les facteurs épigénétiques sont régulés de manière dynamique, selon les changements apparaissant au cours du développement ou selon les signaux environnementaux. Les différents états d'activation des macrophages sont associés à des signatures épigénétiques distinctes, suggérant ainsi que l'intégration des signaux spécifiques du microenvironnement façonne le paysage épigénomique et se traduit par un continuum d'états transcriptionnels et fonctionnels distincts. De plus, ces mécanismes épigénétiques ont aussi la capacité d'affecter la plasticité du phénotype, permettant au macrophage de passer rapidement d'un programme cellulaire à un autre (194).

Les molécules d'ADN s'associent à des protéines d'histones et forment ainsi une structure macromoléculaire complexe appelée chromatine. Les facteurs épigénétiques agissent principalement au niveau de la conformation de la chromatine, en y régulant l'accessibilité de l'ADN, influençant ainsi la liaison des facteurs de transcription et l'expression des gènes. Globalement, les modifications épigénétiques peuvent être divisées en trois catégories : (i) les modifications post-transcriptionnelles des histones, (ii) la méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et (iii) les modifications post-transcriptionnelles de l'acide ribonucléique messager (ARNm) (194). Nous allons évoquer brièvement quelques exemples de ces modifications épigénétiques dans l'activation des macrophages.

1.3.3.3.1. Les modifications post-transcriptionnelles des histones

Les histones peuvent subir un grand nombre de modifications post-traductionnelles, telles que l'acétylation/désacétylation et la méthylation/déméthylation de leurs résidus lysine (K). Ces modifications influencent l'accessibilité de l'ADN. D'une part, l'acétylation par des histones acétyltransférases favorise l'activité transcriptionnelle, tandis que l'élimination de ces groupes acétyles par les histones désacétylases (HDACs) est liée à l'inhibition de la transcription (195). Par exemple, au niveau des macrophages, l'HDAC3 a été décrite comme une enzyme responsable de la désacétylation des histones dans les régions régulatrices de gènes induits par l'IL-4 (196). La suppression d'HDAC3, induit l'expression des gènes régulés par l'IL-4. En particulier, il a été montré que le facteur de transcription STAT6 ainsi activé par l'IL-4 agit comme un répresseur transcriptionnel de plusieurs gènes inflammatoires, de manière dépendante de HDAC3 (197). D'autres études ont montré que les HDAC6 et HDAC7 sont impliqués dans l'expression de gènes pro-inflammatoires, dans les macrophages stimulés par le LPS (198,199). D'autre part, la méthylation et la déméthylation des histones sont induits respectivement par les histones méthyltransférases et les histones déméthylases. Selon l'emplacement et le nombre de groupes méthyles (CH_3) modifiés au niveau de l'histone, cette modification épigénétique induit soit une activation ou soit une inhibition transcriptionnelle. Par exemple, la méthyltransférase SMYD3 permet la méthylation de la lysine 4 sur l'histone 3 (H3K4) au niveau des promoteurs des gènes régulés par l'IL-4 et l'IL-13, et induit l'expression

de ces derniers dans les macrophages activés par l'IL-4 et IL-13 (200). La méthyltransférase KMT6, quant à elle, favorise la méthylation H3K27, au niveau du locus du facteur de transcription SOCS3, et inhibe l'expression de ce dernier, entraînant une hausse d'expression des gènes pro-inflammatoires en réponse à l'IFN-γ (194,201).

1.3.3.3.2. La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN, catalysée par les ADN méthyltransférase (DNMT), permet l'ajout d'un groupement CH_3 au niveau des groupes de dinucléotides 5'-cytosine-phosphate-guanine-3', appelés îlots CpG. Cette modification épigénétique conduit à une inhibition de la transcription des gènes. Par exemple, dans l'activation des macrophages, l'hyperméthylation de SOCS1 médiée par la DNMT1 conduit à une perte d'expression de SOCS1 et favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6), induite par le LPS (202).

1.3.3.3.3. La modification d'expression des microARN

Les microARN (miRs) représentent un type d'ARN non codant, ciblant les régions 3' et 5' non traduites de l'ARNm, pour stimuler sa dégradation et la répression de la traduction. Les différents signaux de l'environnement modulent l'expression de plusieurs miRs. Par exemple, le miR-155 est régulé positivement en réponse à différents ligands TLR (203) et négativement par l'IL-10 (204), et permet au macrophage d'adopter des fonctions inflammatoires dans un contexte tumoral (205) ou d'athérosclérose (206). Une grande partie des miR est également impliquée dans des boucles de rétroaction négative, visant à contrôler l'expression des gènes inflammatoires. Par exemple, le miR-21 induit par le LPS, limite en retour l'activation de NF-κB et l'expression d'IL-6, tout en favorisant l'expression de l'IL-10 (207).

Pour conclure, les macrophages présentent une capacité importante à intégrer les signaux du micro-environnement, afin d'adopter divers états d'activation, caractérisées en aval par différentes voies de régulation et en amont par des fonctions biologiques distinctes.

1.4. Le rôle des macrophages dans le développement des pathologies

1.4.1. Généralités

Les macrophages sont présents au niveau des tissus de l'ensemble de l'organisme et présentent une grande diversité fonctionnelle. Lors d'agressions chroniques, les fonctions des macrophages peuvent être impactées, les impliquant alors dans le développement de divers états pathologiques. Par exemple, en raison de la capacité des macrophages à initier et à contrôler les réponses immunitaires régulant l'inflammation, les altérations de ces mécanismes immunologiques peuvent entraîner une inflammation excessive et persistante, ce qui est largement apprécié dans la pathogenèse de nombreux états inflammatoires (e.g. maladies

auto-immunes, infection au SARS-CoV-2) (208,209), neurodégénératifs (210), métaboliques (211), cardio-vasculaires (212) et tumoraux (213). Le rôle des macrophages a particulièrement été décrit dans le développement du cancer et la plasticité fonctionnelle de ces cellules représente une cible de thérapeutique très étudiée pour développer des stratégies anti-tumorales (213).

1.4.2. Cancer et macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

La progression tumorale est modulée par le microenvironnement local, composé d'un ensemble hétérogène de cellules immunitaires, de cytokines et chimiokines, de cellules stromales et de la matrice extracellulaire (214). Parmi les nombreux types de cellules immunitaires présents dans la tumeur, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont les plus abondants (215). De nombreuses données pré-cliniques et cliniques montrent que les TAMs jouent un rôle pro-tumoral (216). De plus, leur importante infiltration au niveau du microenvironnement tumoral (TME) a été corrélée à un mauvais pronostic pour les patients, dans la plupart des cancers (217–220).

1.4.2.1. Origine des TAMs

Les avancées dans la caractérisation de l'ontogenèse des (cf. 1.1.1) ont rapidement posé la question si ces différences d'origine des macrophages se retrouvent au niveau du TME. Récemment, il a été confirmé que le pool de TAMs est composé à la fois de macrophages résidents et de macrophages dérivés de la moelle osseuse (51,221–223). Dans le contexte tumoral, les macrophages résidents sont les premières cellules immunitaires exposées aux facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales et le TME, contribuant ainsi à la génération de TAMs. Dans la plupart des tumeurs, ce pool de macrophages résidents est enrichi par des macrophages infiltrants, issus du recrutement de monocytes circulants en réponse à la sécrétion de signaux du TME (e.g. CCL2, CCL5, CSF-1, VEG ou TGF-β) (224). Parmi ces signaux, l'axe CCR2-CCL2 joue un rôle important. Le récepteur CCR2 exprimé par les monocytes circulants est reconnu par son ligand CCL2, sécrété par les cellules tumorales et stromales, favorisant ainsi l'extravasation des monocytes dans le TME (225). Le phénotype des macrophages est ainsi modulé à la fois par les signaux tissulaires mais également tumoraux.

La contribution des macrophages résidents et celle des macrophages dérivés de la moelle osseuse à la population de TAMs varient en fonction du type de cancer. Dans un modèle murin de cancer du sein, le nombre de TAMs dérivés de monocytes augmente au cours du temps, expliquant que la déplétion des monocytes circulants réduise la croissance tumorale, tandis que la déplétion des macrophages résidents n'a pas d'impact (221). En revanche, dans un modèle murin de cancer du pancréas, les TAMs dérivés des macrophages résidents sont majoritaires. Leur ablation spécifique diminue la charge tumorale, ce qui n'est pas observé sur les souris déficientes pour CCR2 (222). Enfin dans un modèle de cancer pulmonaire, les

macrophages résidents interstitiels et les macrophages dérivés de la moelle osseuse contribuent tous les deux au pool de TAMs (223). L'ensemble démontre bien que selon l'organe touché, l'origine des TAMs varie (**Figure 11**).

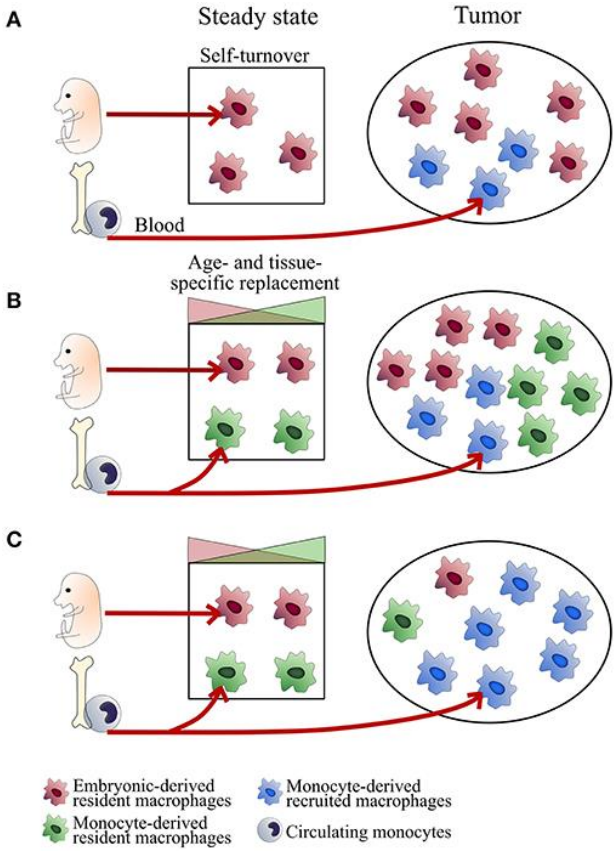


Figure 11 - L'origine des TAMs est dépendante du tissu.
(A) Au niveau des tumeurs situés dans des tissus, principalement composés de macrophages d'origine embryonnaire, ces derniers s'accumulent et peuvent être associés à un recrutement monocytaire (microglie). (B) Dans les tissus où les macrophages résidents ont une origine double, les macrophages d'origine embryonnaires et dérivés de monocytes peuvent constituer le pool de TAMs, en plus d'un recrutement de monocytes (pancréas, peau). (C) Dans certains cas, ce dernier peut être majoritaire (modèle de tumeurs ectopiques) (226).

Comme évoqué dans la partie 1.1.2, le lien entre origine et fonction des macrophages peut être discuté dans le contexte tumoral. Au cours des dernières années, plusieurs études ont démontré que les TAMs d'origine distincte jouent des rôles différents à la fois sur la progression tumorale et sur la modulation de l'immunité anti-tumorale (222,223,227,228). Par exemple, dans un modèle de cancer pulmonaire, les TAMs dérivés des monocytes ont été impliqués dans la dissémination métastatique, tandis que les TAMs résidents sont associés à la croissance tumorale (223). De manière intéressante, dans un autre modèle de tumeur pulmonaire, l'inverse est observé, avec cette fonction d'invasivité des cellules tumorales décrite pour les TAMs résidents (227). La diversité fonctionnelle des TAMs ainsi observée pourrait être expliquée par des caractéristiques spécifiques à l'ontogenèse, mais également par la spécificité de la niche

tissulaire et du TME associé (226).

1.4.2.2. Initiation tumorale et TAMs

De manière semblable à la perturbation homéostatique déclenchée par la reconnaissance de cellules apoptotiques, de débris cellulaires ou de micro-organismes, les cellules tumorales déclenchent l'activation des macrophages. Il s'en suit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. L'instauration de cet environnement inflammatoire chronique initie la tumorigenèse dans de nombreux types de cancer, comme ceux du côlon ou de l'estomac (229). A mesure que la tumeur se développe, les signaux du microenvironnement influencent les fonctions des macrophages afin d'orienter la réponse immunitaire d'un rôle cytotoxique à un rôle de soutien tumoral (**Figure 12**) (230).

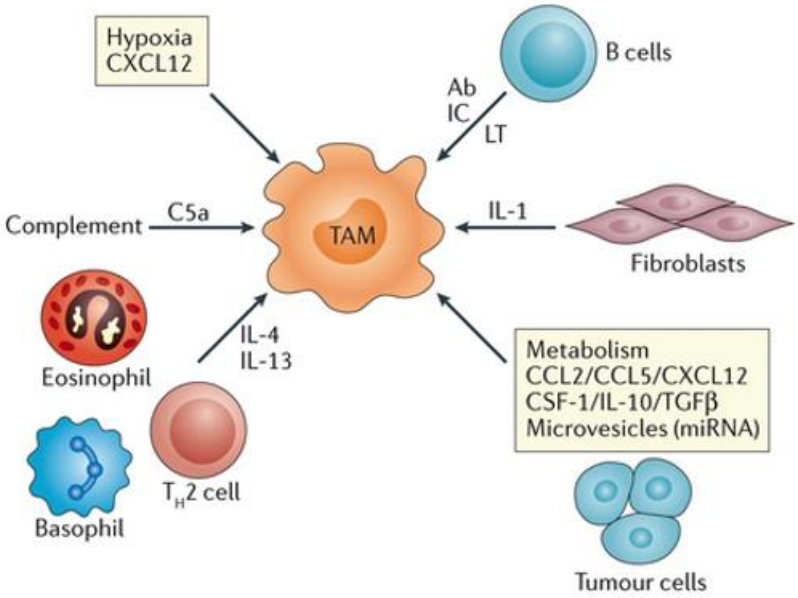


Figure 12 - Les signaux du TME orientant les fonctions des TAMs.
Les fonctions des TAMs peuvent être influencées par l'interleukine-4 (IL-4) et 13 (IL-13) sécrétées par les cellules T $CD4^+$ activées, les anticorps (Ab) et complexes immuns (IC) des cellules B, les composants de l'activation du complément (C5a), mais également par les facteurs dérivés des cellules stromales, tels que l'IL-1 (230).

1.4.2.3. Fonctions des TAMs

Les fonctions des TAMs sont déterminées par une combinaison de facteurs intrinsèques, tels que leur origine, associés à des signaux spécifiques de l'organe, la niche tissulaire et les relations intercellulaires. Sous l'influence de l'ensemble de ces facteurs, il a été décrit un rôle ambivalent des TAMs dans la progression tumorale, avec des fonctions pouvant être à la fois pro-tumorales et anti-tumorales (231).

1.4.2.3.1. Fonctions anti-tumorales

Les fonctions anti-tumorales des TAMs sont centrées autour de l'élimination des cellules tumorales, soit directe par le biais de la phagocytose ou l'induction de l'apoptose, ou soit indirecte par le recrutement et l'activation de cellules immunitaires adaptatives. En réponse, les cellules tumorales détournent ces fonctions, tout au long de leur progression. D'une part, la phagocytose des cellules tumorales est induite après reconnaissance de signaux de dangers tumoraux par les TAMs. De nombreuses tumeurs échappent néanmoins à ce processus, en renforçant leurs signaux « *don't eat me* », tel que CD47 et le ligand 1 de la mort programmée (PD-L1) (232). Les TAMs conservent leur activité phagocytaire en éliminant les débris cellulaires s'accumulant dans le TME. Cette efferocytose est suivie par la sécrétion de cytokines impliquées la réparation tissulaire et l'immunosuppression, créant alors un environnement favorable à la tumeur (233). D'autre part, l'apoptose des cellules tumorales est induite par la sécrétion de facteurs solubles cytotoxiques par les TAMs, tels que le NO, les ROS et le TNF-α (234). Cependant, ce processus léthal peut également permettre de sélectionner les sous-populations de cellules tumorales résistantes à ces voies apoptotiques (235). Enfin, le recrutement et l'activation des cellules T sont induits par la présentation des antigènes tumoraux. Par le biais de la présentation croisée aux lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$, les TAMs sont capables d'induire la réactivation et la cytotoxicité des cellules T dans le TME (236). La pression immunogène ainsi exercée par les TAMs a pour conséquence de sélectionner la perte d'expression de CMH de classe I des cellules tumorales (237).

1.4.2.3.2. Fonctions pro-tumorales

Dans les tumeurs avancées, les TAMs acquièrent des fonctions plus immunosuppressives, dont les mécanismes sont largement décrits dans la littérature, dont certains sont illustrés dans la **Figure 13**. Premièrement, les TAMs induisent l'inhibition des cellules effectrices de l'immunité par divers mécanismes. L'expression des molécules du CMH, telle que la protéine HLA-G interagissant avec le récepteur NKG2, à la surface des cellules NK et d'un sous-ensemble de cellules T, inhibe l'activation de ces cellules (238). L'expression des ligands PD-L1 et PD-L2 se liant au récepteur inhibiteur lymphocytaire PD-1, permet aux TAMs d'induire l'épuisement des cellules T (239). Les TAMs expriment aussi les ligands des récepteurs de mort Fas et TRAIL, leur fixation sur leur récepteur à la surface des cellules T déclenche l'apoptose de ces cellules (238). De manière indirecte, la déplétion de la L-arginine au sein du TME, par l'expression de l'arginase-1 de la part des TAMs, conduit à l'expression d'un récepteur aux cellules T (TCR) non fonctionnel par la perte de la chaîne CD3-ζ (238). La sécrétion d'IL-10 et de TGF-β des TAMs exerce, elle aussi, un effet négatif sur les fonctions des cellules T $CD8^+$ (240,241), et sur la migration des DC (242). Cette production d'IL-10 et de TGF-β permet également la différenciation des cellules T $CD4^+$ en cellules T régulatrices (Treg), connues pour supprimer la cytotoxicité induite des cellules T $CD8^+$ (243). De plus, la sécrétion de chimiokines CCL5, CCL20 et CCL22 induit aussi le recrutement de cellules Treg naturelles (238). En retour les cellules Treg

génèrent une boucle de rétroaction positive, favorisant l'induction d'un phénotype immunosuppresseur des TAMs (244). Par ailleurs, les fibroblastes associés au cancer (CAFs) induits par les TAMs, en plus d'isoler les cellules tumorales de l'infiltrat immunitaire par le remodelage de la matrice extracellulaire (ECM) favorise aussi, en retour, le phénotype immunosuppresseur des TAMs (245). Enfin, les TAMs participent également à l'oxygénation du TME. Dans les zones hypoxiques, les TAMs sont activés par la signalisation du facteur induit par l'hypoxie (HIF), stimulant leur activité pro-angiogénique afin de développer le réseau vasculaire au sein de la tumeur. Il s'en suit la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les TAMs, tels que le VEGF-A, le facteur de croissance placentaire (PlGF, pour *placental growth factor*), WNT7B (membre de la famille Wnt 7B), TGF-β et la thymidine phosphorylase (TP) (246). Ces TAMs angiogéniques ont été caractérisés par l'expression du récepteur tyrosine kinase TIE2 (246).

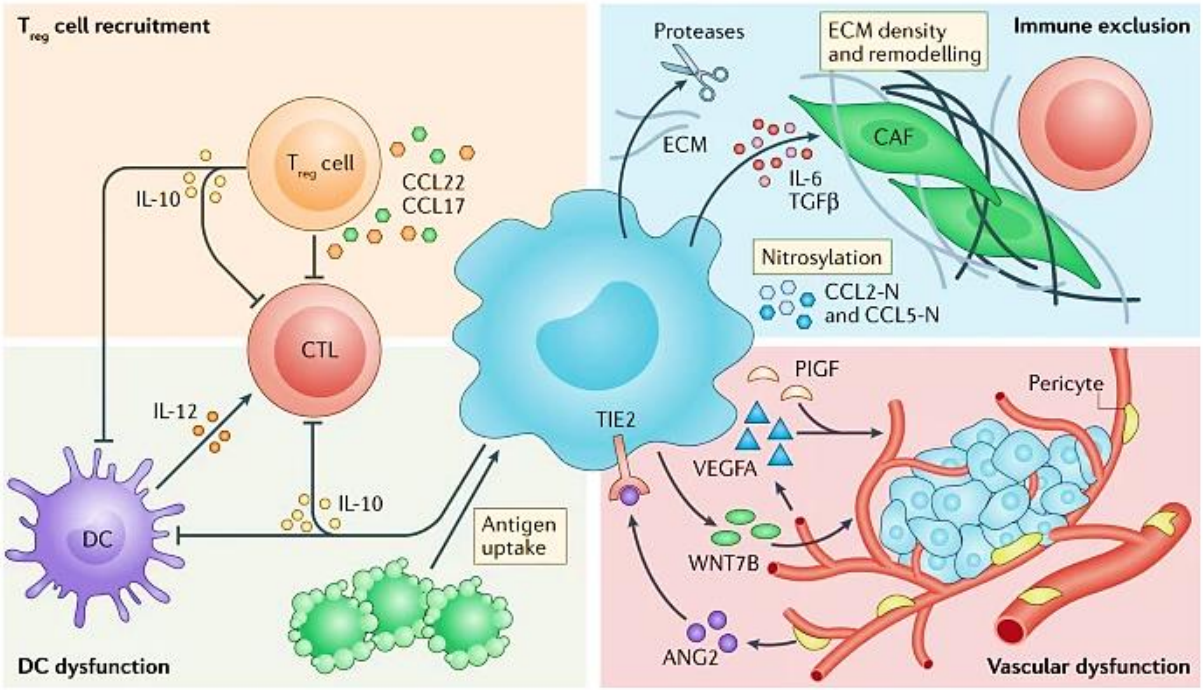


Figure 13 - Exemples des fonctions pro-tumorales des TAMs.

Les TAMs favorisent un microenvironnement tumoral immunosuppresseur par plusieurs mécanismes, dont (haut gauche) le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives, (haut droite) le remodelage de la matrice extracellulaire (ECM), (bas droite) la modulation de la structure vasculaire et (bas gauche) l'inhibition des cellules immunitaires stimulant la réponse anti-tumorale. ANG2 : angiopoiétine 2 ; CAF : fibroblastes associés au cancer ; CCL : ligand de chimiokine CC ; CTL : lymphocytes T cytotoxiques ; DC : cellule dendritique ; IL : interleukine ; PlGF : facteur de croissance placentaire ; Treg : lymphocytes T régulateurs ; VEGFA : facteur endothelial de croissance A ; WNT7B : membre de la famille Wnt 7B (247).

1.4.2.4. Invasion tumorale et TAMs

L'invasion tumorale peut aboutir à la formation de métastases, impliquant l'intravasation de cellules tumorales dans la circulation, puis l'installation de ces cellules circulantes dans une niche d'un organe distant. Les TAMs sont impliqués dans chaque étape de ce processus métastatique (248). Premièrement, la dissémination des cellules tumorales induite par les TAMs passe d'une part par l'activation de la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) des cellules tumorales (249) et par le remodelage de la ECM, impliquant la production d'enzymes protéolytiques telles que les cathepsines et les métalloprotéinases matricielles MMP2, MMP7 et MMP9 (238,250). D'autre part, les TAMs impactent l'intégrité de la jonction endothéliale favorisant ainsi l'intravasation des cellules tumorales (251). Enfin, les TAMs interviennent dans la survie des cellules tumorales circulantes, par l'activation paracrine de voies de survie des cellules cancéreuses (252). Deuxièmement, le recrutement des cellules tumorales au niveau des organes distants est permis par la rééducation des macrophages de ces organes par la tumeur résiduelle, notamment par la sécrétion d'un gradient de chimiokines, afin d'induire une niche pré-métastatique (253). Enfin, les TAMs par la sécrétion de multiples facteurs solubles, tels que le VEGF-A, favorisent l'extravasation des cellules tumorales (254). Il a été défini un phénotype transcriptionnel et fonctionnel des TAMs au niveau métastatique, appelés ainsi macrophages associés aux métastases (MAMs) (216).

1.4.2.5. Résistance thérapeutique et TAMs

Une infiltration importante de TAMs au niveau tumoral en plus d'être corrélée à un mauvais pronostic, a aussi été corrélée à des résultats cliniques négatifs, dans la majorité des cancers (255), soulignant ici un possible rôle des TAMs dans la résistance thérapeutique. Plusieurs études démontrent ainsi que les TAMs impactent négativement la réponse thérapeutique, par plusieurs mécanismes, tels que l'activation des voies de survie des cellules tumorales. Dans un modèle de cancer gastrique, le traitement par chimiothérapie induit une sécrétion accrue de CXCL5 par les TAMs, qui active la voie PI3K/AKT/mTOR au niveau des cellules tumorales. Cette voie joue un rôle central dans la prolifération cellulaire et son activation dans ce contexte est associée à une chimiorésistance induite par les TAMs (256). Les interactions directes avec les composants du TME peuvent également constituer un mécanisme de résistance thérapeutique induit par les TAMs. Les TAMs ont notamment été impliqués dans la résistance aux anti-PD-1, par leur expression accrue de molécules telles que PD-L1 et PD-L2, inhibant l'activation des cellules T $CD8^+$ (257). De plus, dans un modèle murin de métastases hépatiques, il a été montré que les TAMs par induction de l'interaction FasL-Fas avec les cellules T $CD8^+$ sont responsables de l'apoptose de ces cellules T et impacte ainsi l'efficacité des inhibiteurs de checkpoints immunitaires (258). Enfin, après traitement, les TAMs peuvent induire une rechute tumorale. D'une part, l'élimination des débris tumoraux engendrés par les traitements, conduit à la sécrétion de cytokines et de lipides induisant la sélection de nouveaux clones de cellules tumorales résistantes (259). D'autre part, le remodelage du TME par les TAMs, notamment par

la sécrétion de VEGF-A, favorise la reprise de la vascularisation et ainsi de la croissance tumorale (260).

1.4.2.6. Ciblage thérapeutique des TAMs

Les TAMs jouent ainsi un rôle central au cours de la progression tumorale et la réponse thérapeutique, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix pour améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces dernières années, de multiples approches thérapeutiques pour cibler les TAMs se sont ainsi développées en clinique (**Figure 14**) et peuvent se diviser en quatre stratégies (**Figure 15A**).

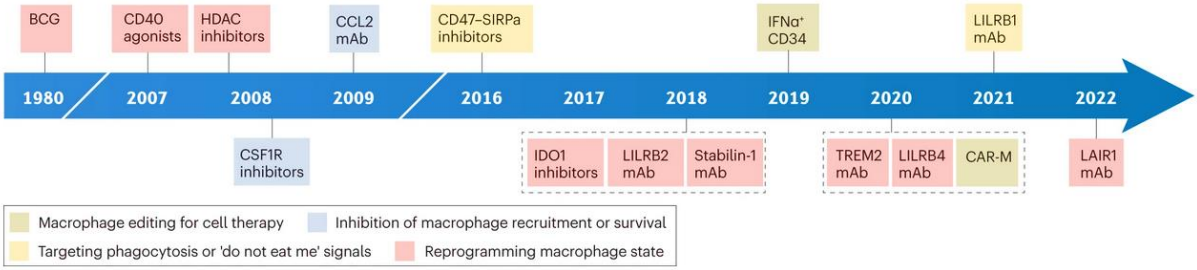


Figure 14 - Chronologie de l'entrée en clinique des principales stratégies ciblant les TAMs.
BCG : bacilli Calmette–Guérin ; HDAC : histone désacétylase ; CSF1R : *colony-stimulating factor 1 receptor* ; CCL2 : ligand 2 de chimiokine CC ; mAb : anticorps monoclonal ; SIRPα : *signal regulatory protein-α* ; IDO1 : 2,3-dioxygénase indoléamine 1 ; LILRB : *leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member* ; IFNα : interféron-α ; TREM2 : *triggering receptor expressed on myeloid cells 2* ; CAR-M : chimeric antigen receptor macrophage ; LAIR1 : *leukocyte-associated immunoglobulin like receptor 1* (216).

1.4.2.6.1. L'inhibition du recrutement des TAMs

Les principales voies de signalisation favorisant le recrutement des TAMs correspondent aux axes CCL2/CCR2 et CCL5/CCR5. Dans un modèle préclinique de cancer du sein, il a été montré que le blocage de l'axe CCL2/CCR2 inhibe le recrutement des macrophages et retarde la progression tumorale et la formation de métastases (225). Plusieurs inhibiteurs ciblant CCR2 ou CCL2 font l'objet d'essais cliniques de premières phases, ce qui est le cas également pour les inhibiteurs de l'axe CC5/CCL5 (261).

1.4.2.6.2. L'inhibition de la survie des TAMs

Dans le cadre du ciblage de la survie des TAMs, la principale cible étudiée est l'axe CSF-1/CSF-1R. Plusieurs applications précliniques ont démontré que l'inhibition de cet axe combinée à de la chimiothérapie, radiothérapie ou immunothérapie, limite la résistance tumorale dans des modèles murins (262,263,257). Depuis, des inhibiteurs du CSF-1R ainsi que

des petites molécules inhibitrices de CSF-1R sont en cours d'essais cliniques. En 2019, le pexidartinib a été approuvé par l'agence américaine du médicament (*Food and Drug Administrastion* (FDA)) pour le traitement des tumeurs ténosynoviales à cellules géantes (264).

1.4.2.6.3. L'induction des propriétés anti-tumorales des TAMs

Quelques agents thérapeutiques ciblant les TAMs visent aussi à induire leurs rôles anti-tumoraux. L'activation de la phagocytose des cellules cancéreuses par des inhibiteurs de l'interaction CD47/SIRPα en représente un exemple. En 2009, Majeti & al. sont les premiers à démontrer que l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant CD47, surexprimé au niveau tumoral, permet d'induire la phagocytose des cellules souches leucémiques sur un modèle préclinique murin (265). Depuis, le ciblage de cette voie est impliqué dans un grand nombre d'essais cliniques de phases précoces et présente des effets prometteurs (266).

1.4.2.6.4. La reprogrammation fonctionnelle des TAMs

La reprogrammation fonctionnelle des TAMs implique la modulation de l'état d'activation des TAMs, leur permettant de passer d'un phénotype aux propriétés pro-tumorales à un phénotype aux propriétés anti-tumorales. L'activation des macrophages étant régulée par un grand nombre de voies de signalisation différentes (cf. 1.3), leur modulation offre ainsi un nombre important de cibles thérapeutiques potentielles et explique pourquoi la majorité des agents ciblant les TAMs utilisés dans les essais pré-cliniques et appliqués en cliniques (**Figure 14**) vise la reprogrammation fonctionnelle des TAMs. Les cibles thérapeutiques modulant la polarisation des TAMs les plus étudiées sont décrites et résumées dans la **Table 3**.
Parmi ces cibles thérapeutiques, nous pouvons détailler l'exemple des récepteurs TLRs, dont l'activation déclenche une réponse inflammatoire immunostimulatrice importante, médiée par la voie NF-κB. Plusieurs des agonistes TLR (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9) ont ainsi montré sur des modèles précliniques, leur capacité à induire la reprogrammation fonctionnelle des TAMs vers un phénotype anti-tumorale (255). Par conséquent, les agonistes TLR sont considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles pour renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale. Le BCG (Bacille de Calmette et Guérin), et une souche vivante atténuée de *Mycobacterium bovis* stimulant les TLR2 et TLR4. Il s'agit du premier agent stimulant des TLRs approuvé par la FDA (267). L'imiquimod, agoniste du TLR7, a plus récemment été approuvé par la FDA, dans le cadre d'une administration topique dans le carcinome épidermoïde et basocellulaire (268). Enfin d'autres agonistes TLR, tels que l'agoniste TLR3 poly-ICLC et l'agoniste TLR9 vidotolimod, présentent des résultats cliniques prometteurs, sur la réponse immunitaire chez des patients atteints de gliome (269) et sur la levée de la résistance aux ICB chez des patients atteints de mélanome métastatique (270), respectivement.

Récemment, les avancées biotechnologiques ont permis le développement de nouveaux systèmes thérapeutiques, pouvant cibler spécifiquement la plasticité fonctionnelle des TAMs

(**Figure 15B**). Par exemple, la génération de CAR-M (Chimeric Antigenic Receptor-Macrophages), ciblant le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2), a permis d'améliorer la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses, le remodelage du TME et la présentation des antigènes aux cellules T $CD8^+$. L'ensemble induit des caractéristiques pro-inflammatoires et anti-tumorales du macrophage dans un modèle murin de cancer de l'ovaire $HER2^+$ (271). Enfin, le développement de nanoparticules a également permis d'améliorer l'administration spécifique aux TAMs pro-tumoraux d'agents thérapeutiques par plusieurs méthodes, en fonction de la sensibilité au pH du TME (272) ou encore par le couplage avec des protéines de surface ciblant ces TAMs pro-tumoraux (273).

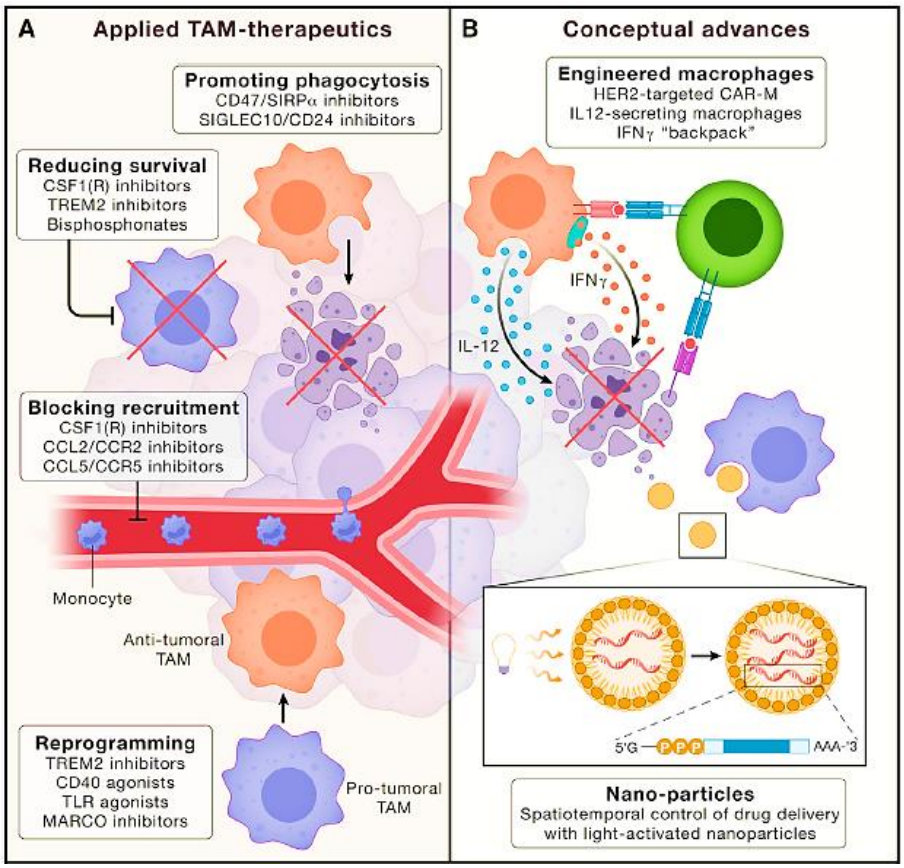


Figure 15 - Exemples de stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs.
(A) Les quatre principales stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs appliquées en thérapeutique. (B) Les avancées conceptuelles pour les prochaines thérapies ciblant les TAMs, comprenant d'une part les macrophages modifiés par ingénierie cellulaire, les CAR-macrophages, et d'autre part l'utilisation de nouveaux vecteurs d'administration avec les nanoparticules (231).

Pour conclure, les macrophages du fait de leur diversité fonctionnelle sont impliqués dans plusieurs pathologies et notamment à toutes les étapes du développement tumoral. De multiples stratégies thérapeutiques ciblant les TAMs se sont développées, dans le but d'améliorer la réponse anti-tumorale. En particulier, la reprogrammation des TAMs permise par leur plasticité fonctionnelle et caractérisée par l'induction d'un phénotype anti-tumoral des

TAMs, représente un axe thérapeutique majeur très étudié, pour lequel de nombreuses cibles thérapeutiques ont été identifiées (**Table 3**). Il a récemment été montré que la radiothérapie est impliquée dans cette reprogrammation fonctionnelle des TAMs (274).

Agent thérapeutique	Cible thérapeutique	Voies de signalisation activées et/ou conséquences fonctionnelles	Modèles/Indications	Essais précliniques (Réf)/cliniques (NCT)
Imiquimod Resiquimod	Agoniste TLR7 Agoniste TLR7/8	Activation de la voie NF-κB qui déclenche la sécrétion de cytokines immunostimulantes, dont l'IFN de type I (275).	Carcinome baso-cellulaire superperficiel Mélanome	AMM (FDA et EMA) Phase II : NCT00960752
Dacetuzumab Lucatumumab	Agonistes CD40 (récepteur du TNF)	Induction de l'expression du CMH-I et la sécrétion de cytokines inflammatoires, stimule la réponse anti-tumorale des cellules T (276).	Leucémie lymphoïde chronique Lymphome hodgkinien et non hodgkinien	Phase II : NCT00283101 Phase II : NCT00670592
Microbiote DMXAA	Agonistes STING	Induction de la voie TBK1/IRF3 et production d'IFN de type I (277,278).	Lymphome, carcinome du colon et mélanome Cancer du sein déplété pour BRCA1	(277) (278)
Anticorps anti-TREM2 (PY314)	TREM2	Modulation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80/CD86) (279).	Tumeurs solides avancées	Phase Ia/Ib : NCT04691375
Idelalisib IPI-549	Inhibiteurs PI3Kγ	Activation de NF-κB et inactivation de C/EBPβ, favorisant la réponse immunostimulatrice des TAMs (280).	Leucémie lymphoïde chronique (+/-rituximab) Carcinome mammaire	Phase III : NCT01539512 (280)
Anticorps anti-MARCO	Récepteur éboueur MARCO	Induction de l'élimination tumorale par activation des cellules NK, médié par l'expression de TRAIL (281,282).	Mélanome (+/- ICB)	(281)
CHR-2845 TMP195	Inhibiteurs HDACs	Induction de l'accessibilité de la chromatine des gènes médiant l'activité phagocytaire et immunostimulatrice des TAMs (283).	Tumeurs malignes lymphoïdes Cancer du sein et métastases pulmonaires	Phase I : NCT00820508 (283)

Table 3 - Cibles thérapeutiques majoritaires visant la reprogrammation fonctionnelle des TAMs.
C/EBP : *CCAAT/Enhancer-Binding Protein* ; CMH-I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ; HDACs : histones désacétylases ; ICB : inhibiteurs des points de contrôle immunitaires ; IFN : interféron ; NCT : numéro d'essai clinique ; NF-κB : *nuclear factor-kappa B* ; NK : cellules natural killer ; STING : stimulateur des gènes de l'interféron ; TAMs : macrophages associés aux tumeurs ; TLR : récepteur de type Toll ; TREM : *transmembrane protein triggering receptor expressed on myeloid cells* ; TRAIL : *TNF-related apoptosis-inducing ligand*. Adaptée de (255).

2. LA RADIOTHÉRAPIE

La radiothérapie (RT) se base sur l'utilisation de rayons à haute énergie ou de substances radioactives, afin d'endommager les cellules tumorales et stopper leur croissance et leur division.

2.1. De la découverte jusqu'au traitement du cancer

Les rayons X ont été découverts par Wilhem Röngten en 1895. Cette même année, il s'en est suivi le traitement palliatif du tout premier patient atteint d'un cancer à l'aide de ces rayonnements ionisants (284). En parallèle, en 1898, Marie Sklodowska-Curie et Pierre Curie découvrent le radium comme source de rayonnement particulaire et décrivent les effets physiologiques des rayons de radium, aux côtés d'Henri Becquerel, à l'origine de la découverte de la radioactivité naturelle quelques années auparavant (284). Enfin, ce n'est qu'en 1920 que l'intérêt du fractionnement de la dose d'irradiation a été prouvé pour le contrôle de la croissance tumorale et la réduction des effets secondaires (284).

Depuis ces découvertes, l'utilisation de la RT s'est largement développée, jusqu'à représenter aujourd'hui un traitement majeur du cancer, avec plus de 50% des patients atteints de cancer recevant des rayonnements ionisants au cours de leur prise en charge (285). La RT est, en effet, indiquée dans plusieurs types de cancer et peut être utilisée selon plusieurs intentions, en tant que :
- traitement de première ligne de cancers localisés seule ou en association avec la chimiothérapie (285),
- thérapie néo-adjuvante afin de réduire le volume tumorale avant résection chirurgicale (285),
- thérapie adjuvante afin de prévenir les récidives après intervention chirurgicale (e.g. cancer du sein) (285),
- soins palliatifs, en tant que traitement symptomatique, en soulageant la pression tumorale exercée sur les organes environnants, chez les patients en phase avancée ou terminale (286).

La RT peut être délivrée par voie externe, on parle de RT par faisceau externe (EBRT, *external beam radiotherapy*), ou par voie interne. Dans ce dernier cas, soit la source de rayons est introduite à proximité ou au sein des lésions à traiter, on parle de curiethérapie, ou soit les rayons sont administrés par un médicament porteur d'un radio-isotope, sélectivement absorbé par le tissu ciblé, on parle de RT interne vectorisée (285). L'EBRT est la forme la plus courante de RT et au cours du temps différents types d'EBRT se sont développés (287) :
- la RT conformationnelle tridimensionnelle (3D-CRT) remplace la RT 2D et permet la reconstruction 3D de la tumeur et ainsi un meilleur ciblage des rayons vers la zone tumorale (287),
- la RT à modulation d'intensité (IMRT) est un type de RT 3D, permettant de délivrer des rayonnements de différentes intensités selon la région tumorale ciblée (288),

- la RT guidée par l'image (IGRT) se base sur l'imagerie avant et pendant la RT afin de délivrer les rayons selon la progression tumorale (289),
- la RT corporelle stéréotaxique (SBRT) permet d'administrer des doses précises et élevées de radiations, en concentrant plusieurs faisceaux de rayons au niveau de tumeurs bien définies et situées dans le corps (290),
- la protonthérapie utilise des faisceaux de protons, qui ne diffusent pas dans les tissus adjacents lors de leur trajet dans le corps et s'arrêtent une fois dans la tumeur, permettant ainsi de réduire la dose de rayonnement reçue par les tissus adjacents sains (291).

Récemment, une nouvelle technologie de RT s'est développée : la RT FLASH. Elle consiste à délivrer une dose à des débits de dose ultra-élevés (>40Gy/s), largement supérieurs aux débits de dose conventionnels (environ 5Gy/min) utilisés en clinique (292). Plusieurs études ont montré la capacité de l'irradiation FLASH à épargner les tissus sains tout en maintenant une cytotoxicité tumorale en comparaison à la RT conventionnelle, dans plusieurs modèles *in vivo* (293–295).

L'intégration de tous ces développements technologiques permet une RT plus précise, tout en minimisant ses limites associées aux toxicités aiguës et chroniques des tissus sains avoisinants. Parallèlement, l'élargissement des connaissances en biologie des radiations, par la mise en lumière des différents mécanismes cellulaires engendrés, stimule également le développement de la RT et la limitation de la toxicité associée.

2.2. La radiobiologie

2.2.1. Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes (ou rayonnements ionisants, RI) constituent une forme d'énergie importante capable de transformer les atomes, en éjectant les électrons du nuage électronique gravitant autour : on parle d'ionisation de la matière. Les RI sont composés (i) de rayonnements électromagnétiques de haute énergie (les rayons X et les rayons γ) et (ii) de rayonnements particulaires (particules alpha ou bêta et neutrons) (296). Nous nous intéresserons uniquement au premier cas.

Les rayonnements électromagnétiques, composés des rayons X et γ, se caractérisent par l'émission de faisceaux de photons, qui sont largement utilisés en RT externe. Les photons émis sont capables de pénétrer profondément les tissus des patients (296). Selon l'énergie du photon émis (E) et le numéro atomique (Z) du matériau ciblé par les rayons, trois processus d'interaction entre le photon et la matière ont été décrits :
- <u>l'effet photoélectrique</u> : l'énergie du photon incident est entièrement transférée à un électron qui est éjecté de l'enveloppe interne de l'atome (**Figure 16A**). Cela entraîne un réarrangement du nuage électronique, avec soit émission d'un photon de fluorescence ou soit d'un électron Auger. Cet effet photoélectrique est utilisé pour l'imagerie diagnostique (296).

- l'effet Compton : le photon incident transfère une partie de son énergie à un électron périphérique, il s'en suit l'éjection de l'électron et du photon avec son énergie restante (**Figure 16B**). En RT, c'est l'interaction la plus rencontrée (296).
- la création de paires : le photon interagit avec le noyau de l'atome et toute son énergie est convertie en un positron et un électron (**Figure 16C**). Le positron, en rencontrant un électron de la matière, s'annihile en émettant deux photons de 511keV (296).

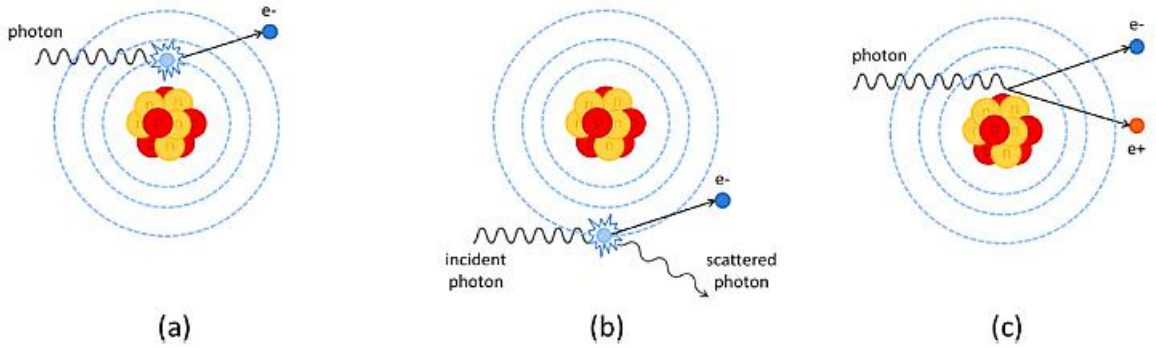


Figure 16 - Les trois principaux processus d'interaction des photons en RT.
(A) Effet photoélectrique ; (B) Effet Compton ; (C) Création de paires. Adaptée de (296).

Ce sont ces électrons éjectés à la suite de l'interaction photons-matière, qui sont responsables de l'ionisation de la matière. Les rayons X et γ ionisent ainsi de manière indirecte le tissu cible.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les effets observés seront ceux crées par des photons, issus de rayons X.

2.2.2. Effets cellulaires directs et indirects

Les IR entraînent des dommages cellulaires, dus à l'absorption d'énergie générée par les électrons. Ces dommages cellulaires peuvent être divisés en effets directs ou indirects. Dans le cas d'un transfert d'énergie linéaire (TEL) élevé (particules alpha, neutrons), ou lorsque de fortes doses de RI sont appliquées, les effets directs prédominent aux effets indirects (297).

Les effets directs

La première cible directe des RI au niveau cellulaire est l'ADN, engendrant une déformation structurelle, appelée dommage à l'ADN. Il est estimé qu'entre 30 à 40% des dommages à l'ADN induits par les RI sont causés par des effets cellulaires directs (298). Les lésions de l'ADN induites par l'irradiation comprennent les modifications bases-sucres, les cassures simple brin (CSB) et les cassures double brins (CDB), ces dernières étant les plus cytotoxiques (299). Récemment, il a été décrit des sites de « cluster » de dommages induits par les RI, regroupant plusieurs lésions de l'ADN. La formation de ces clusters augmente avec un rayonnement de TLE élevé et influe la réparabilité des dommages (299).

Les effets indirects

L'effet indirect des RI affecte, d'une part, les molécules d'eau, principal constituant de la cellule et provoque la radiolyse de l'eau, engendrant la génération de radicaux libres, tels que l'hydroxyle (HO•), l'anion superoxyde (O2•⁻) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). D'autre part, les RI peuvent aussi activer les NOS afin de générer des espèces réactives de l'azote. Les ROS et RNS ainsi produits interagissent avec les molécules d'ADN et induisent des dommages structurelles moléculaires (297). Ces effets cellulaires indirects sont responsables entre 60 à 70% des lésions de l'ADN induites par les RI (298).

2.2.2.1. Dommages à l'ADN

L'induction des lésions cellulaires de l'ADN déclenche des voies de réponse de réparation de l'ADN. Selon le type de lésions, la signalisation des dommages à l'ADN diffère et implique différents senseurs, transducteurs et effecteurs du signal. Les CDB sont détectées par le complexe MRE11-RAD50-NBS1 (MRN), qui va recruter et activer la kinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*). Les CSB sont, quant à elles, détectées par la protéine de réplication A (RPA) et le complexe RAD9-RAD-1-HUS-1 (9-1-1), qui activent la kinase ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*). Les kinases ATM et ATR, ainsi activés, phosphorylent différents médiateurs, dont la protéine histone H2AX. La forme phosphorylée de cette dernière sur la sérine 139, appelée γH2AX, permet l'amplification de la signalisation des dommages à l'ADN, notamment par le recrutement d'autres protéines de signalisation (MDC1, RNF8, RAP80, 53BP1) (300). L'accumulation de molécules H2AX phosphorylées au niveau des cassures doubles brins est appelée « foci » de γH2AX. La formation de ces derniers a lieu après quelques minutes d'irradiation (301). L'activation d'ATM et d'ATR phosphoryle également des substrats impliqués dans l'induction des points de contrôle du cycle cellulaire : tels que la kinase 2 du point de contrôle (Chk2) et Chk1 respectivement, ou encore la protéine du gène 1 du cancer du sein (BRCA1). La kinase Chk2 phosphoryle la protéine suppresseur de tumeur p53, augmentant l'expression de p21 et induisant l'arrêt en phase G1, tandis que Chk1 active la phosphatase du cycle de division cellulaire 25 (CDC25), entraînant l'arrêt en phases S et G2/M (302) (**Figure 17**). De plus, il est intéressant de noter que Chk1 peut aussi être impliquée dans l'arrêt du cycle dépendant de p53, tout comme Chk2 dans celui dépendant de CDC25 (303). Enfin, la protéine BRCA1 est impliquée dans le contrôle du point de contrôle G2/M (304).

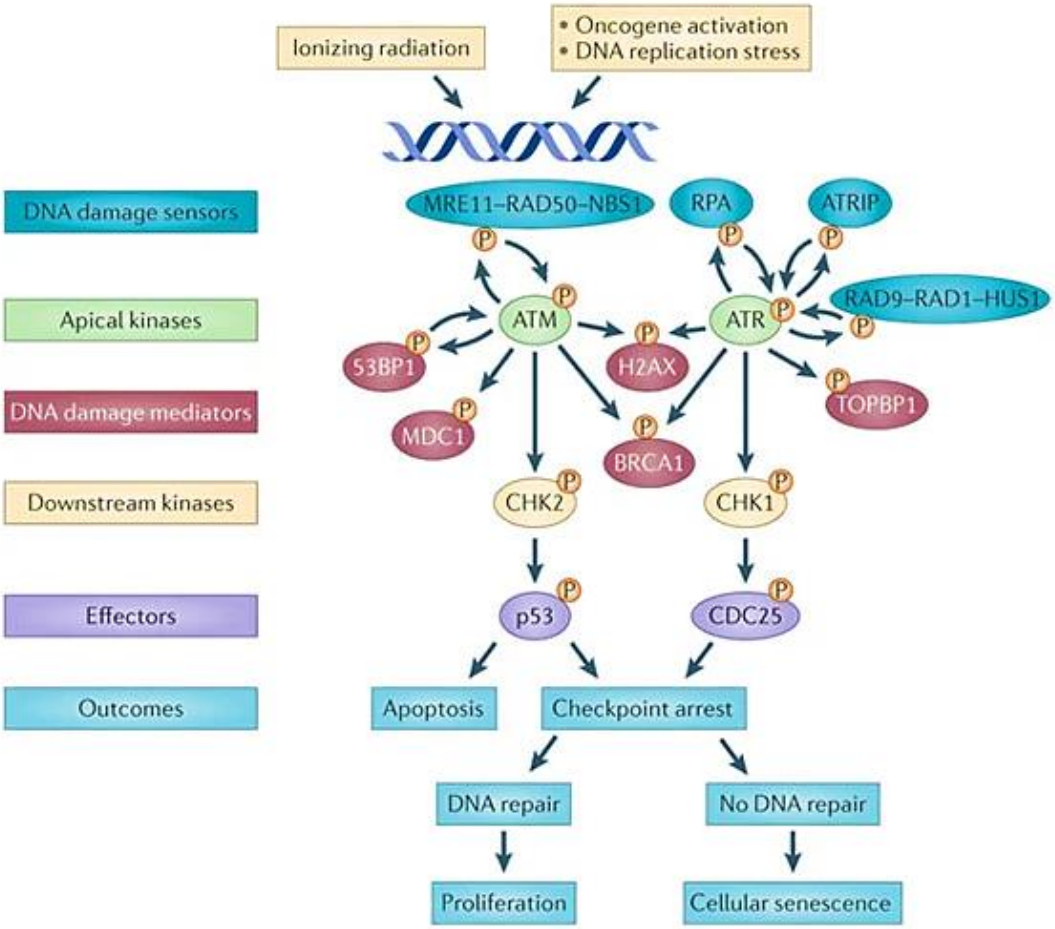


Figure 17 - La signalisation des voies de dommages à l'ADN.
53BP1: *P53-Binding Protein 1* ; ATM : *ataxia telangiectasia mutated* ; ATR : *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related* ; ATRIP : protéine interagissant avec ATR ; BRCA1 : protéine du gène 1 du cancer du sein ; CDC25 : Cell Division Cycle 25 ; CHK1 : kinase 1 du point de contrôle ; CHK2 : kinase 2 du point de contrôle ; DNA : acide désoxyribonucléique ; H2AX : membre X de la famille d'histone H2A ; MDC1 : médiateur 1 du point de contrôle des dommages à l'ADN ; MRE-11 : *Meiotic Recombination homolog 11* ; NBS1 : *Nijmegen breakage syndrome protein 1* ; RPA : protéine de réplication A (305).

Les points de contrôle du cycle cellulaire induits favorisent un arrêt du cycle, afin que les mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place pour restaurer l'intégrité de l'ADN. Brièvement, après la détection de CDB, deux voies de réparation de l'ADN sont impliquées : (i) la jonction non homologue (NHEJ), favorisant la ligature directe des deux extrémités des cassures, et (ii) la recombinaison homologue (HR), permettant la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'une séquence homologue située sur la chromatide sœur (306). De leur côté, les CSB induites par les RI impliquent la voie de réparation par excision des bases (307). Si le processus de réparation n'aboutit pas, l'accumulation de lésions de l'ADN peut soit contribuer à la mort cellulaire (308), la sénescence (309), ou soit conduire à l'accumulation d'anomalies chromosomiques, parfois favorables à l'établissement d'un cancer (310). De plus, il existe de nombreux exemples de prédispositions héréditaires au cancer associées à des

mutations dans des gènes impliqués dans la voie de signalisation des dommages à l'ADN et dans la réparation de l'ADN (e.g. le cancer héréditaire du sein et de l'ovaire, lié à une variante germinale dans BRCA1 et BRCA2 (311,312)). Par conséquent, la réponse et la réparation aux dommages de l'ADN déterminent le destin de la cellule et les réponses tumorales aux RI.

2.2.2.2. Micronoyaux et instabilité génomique

L'instabilité génomique se définit par l'incapacité du génome à conserver son intégrité structurelle et numérique. Elle peut s'expliquer, d'une part par des anomalies structurelles, telles que des mutations ou des réarrangements chromosomiques, et d'autre par des anomalies numériques avec la perte ou le gain de chromosomes entiers, aussi appelée instabilité chromosomique (313). Les défauts dans la réparation des dommages à l'ADN induits par les RI, peuvent être à l'origine d'aberrations chromosomiques et de mutations et ainsi contribuer à l'instabilité génomique induite par les RI (314). En conséquence de cette instabilité génomique et chromosomique induite par les RI, l'ADN est libéré dans le cytoplasme, par la formation de micronoyaux.

Les micronoyaux sont de petits noyaux, isolés dans l'espace du noyau principal. Ils peuvent provenir soit de la perte de chromosomes entiers à l'anaphase (**Figure 18 gauche**) ou soit de fragments d'ADN provenant d'un chromosome acentrique ou de cassures d'ADN non réparées (**Figure 18 droite**) (315). La fréquence de ces micronoyaux a été corrélée au niveau des lymphocytes sanguins, avec la dose de rayonnement (316).

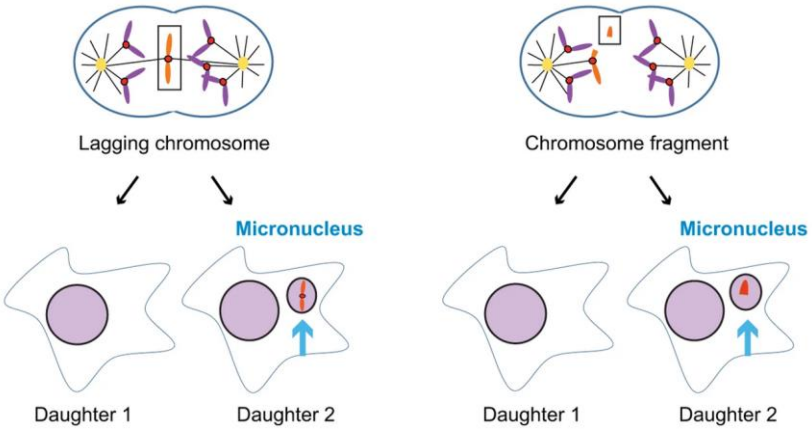


Figure 18 - Mécanismes de formation des micronoyaux (317).

Enfin, les micronoyaux possèdent des défauts dans l'assemblage de la lamine nucléaire, et sont ainsi sujets à la rupture de l'enveloppe nucléaire (318). La rupture des micronoyaux, libère alors l'ADN dans le cytoplasme. Cet ADN cytoplasmique active ensuite des senseurs d'ADN cytoplasmiques, déclenchant des voies de signalisation, conduisant à une réponse interféron de type I (313,315), qui seront décrites ultérieurement.

2.2.2.3. Dysfonctionnement mitochondrial

La production de ROS par les RI est connue pour impacter les mitochondries et en particulier l'ADNmt (319). Il a été montré que les lésions de l'ADNmt entrainent une diminution de l'efficacité de la fonction mitochondriale, se traduisant par une production excessive de ROS mitochondriaux et une nouvelle accumulation de lésions de l'ADNmt, ainsi que des lésions de l'ADN nucléaire (320).

Cependant, les mécanismes impliquant le dysfonctionnement des mitochondries dépendant des RI restent peu clairs. D'une part, une diminution du potentiel de membrane mitochondriale a été observée après irradiation par plusieurs équipes (321,322). D'autre part, plusieurs études ont montré une augmentation significative de la masse mitochondriale, après RI (322–324). Une dépolarisation mitochondriale et une augmentation de la masse mitochondriale peuvent être associées à une fission mitochondriale importante. Dans ce sens, Kobashigawa et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer que les RI induisent des changements dans la dynamique des mitochondries. Ils ont montré que l'exposition aux radiations entraîne une fission mitochondriale excessive dépendante de la protéine DRP1. De plus, l'inhibition de DRP1 empêche la perte de potentiel membranaire mitochondriale ainsi que la production de ROS mitochondriaux. Ils soulignent ainsi que la dynamique mitochondriale dépendante de DRP1 influe sur la dysfonction mitochondriale induite par les RI (325). Dans une autre étude, Jin et *al*. ont démontré que selon le TEL des rayonnements, des différences dans la dynamique des mitochondries sont observées. L'irradiation par des ions carbone à TEL élevé conduit à une fragmentation mitochondriale. En revanche, l'irradiation par rayons X de faible dose favorise la fusion mitochondriale jusqu'à 1Gy, au-delà la fission mitochondriale est détectée. Cette même étude a ensuite montré que la fission observée est dépendante de la phosphorylation S616 de DRP1, médiée par ERK1/2 (326).

Enfin, les mitochondries sont également impliquées dans l'instabilité génomique induite par les radiations, par la libération d'ADNmt dans le cytoplasme. Un excès de stress oxydatif peut perturber l'intégrité de l'ADNmt et conduire à sa libération (313). Une étude utilisant de l'imagerie à super résolution a montré cette libération cytosolique d'ADNmt après irradiation (327). D'autres mécanismes aboutissant à la libération d'ADNmt après RI peuvent être impliqués, comme la formation du canal anionique voltage-dépendant 2 (VDAC2), servant de pore pour la sortie d'ADNmt (328) ou encore la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale au cours de l'apoptose, qui peut être induite par les RI (329). Cette libération d'ADNmt peut jouer un rôle dans l'activation de réponses de l'interféron de type I, qui sera détaillée ultérieurement.

2.2.3. Les conséquences fonctionnelles des radiations ionisantes

2.2.3.1. L'induction de processus de mort cellulaire

Les différentes modalités de mort cellulaire induites après exposition aux RI sont largement décrites dans la littérature. Les différentes voies de signalisation impliquées vont être détaillées brièvement et quelques-unes sont résumées en **Figure 19**.

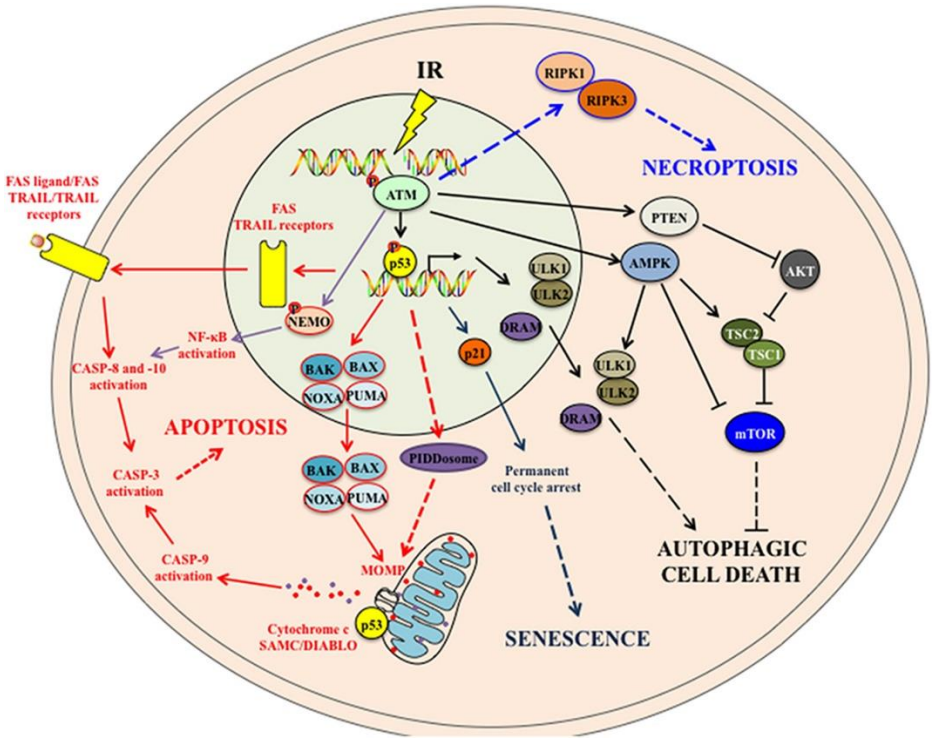


Figure 19 – Exemples des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans les processus de mort cellulaire induits par les RI (330).

2.2.3.1.1. Processus de mort cellulaire typique

Trois types de mort cellulaire induite par la RT ont été identifiés comme des processus de mort cellulaire typique, en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et enzymatiques : (i) l'apoptose (type I), (ii) la mort cellulaire par autophagie (type II) et (iii) la nécrose et nécroptose (type III) ;

L'apoptose est le processus de mort cellulaire programmée le plus induit par les RI. Elle se caractérise par des altérations morphologiques, telles que la fragmentation nucléaire (caryohexis), la condensation de la chromatine (pyknose) et la formation de corps apoptotiques (331). L'initiation de l'apoptose par les RI est médiée par deux voies de signalisation différentes. *La voie intrinsèque* implique des signaux intracellulaires, tels que les dommages à l'ADN en réponse aux RI induisant l'activation de p53, qui conduit à la régulation de l'expression des protéines de la famille BCL-2 (*B-cell lymphoma 2)*. Parmi elles, les protéines pro-apoptotiques BAX (BAX et BAK) vont s'associer et former un pore dans la membrane mitochondriale. Il s'en

suit la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) et la libération de facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome *c*. Ce dernier se lie avec le facteur d'activation de l'apoptose-protéase 1 (Apaf-1) et la pro-caspase-9, formant ainsi un complexe appelé « apoptosome », qui active la caspase-9 par clivage protéolytique. Une fois activée, cette protéase active d'autres caspases en aval, notamment la caspase-3, nécessaire pour initier les caractéristiques apoptotiques (330).
La voie extrinsèque implique des récepteurs transmembranaires de mort, appartenant à la famille des récepteurs au TNF et activés par des signaux de mort (332). L'interaction FasL-Fas est l'une des plus décrites, entraînant le recrutement de la protéine adaptatrice FADD. Cette dernière s'associe ensuite à la pro-caspase 8, formant ainsi un complexe de signalisation induisant la mort (DISC), en entraînant l'activation de la caspase-8 (332). L'irradiation a été montrée comme régulant positivement ces récepteurs de mort, par exemple l'expression de Fas, au niveau des cellules tumorales, par un mécanisme dépendant de p53 (333).

La mort cellulaire par autophagie se définit comme une mort cellulaire de type II, pouvant être induite par l'irradiation. Morphologiquement, elle se caractérise par l'apparition d'autophagosomes dans le cytoplasme (334). Elle est déclenchée à la suite d'une induction excessive d'autophagie, processus distinct se définissant comme une voie lysosomale participant au maintien de l'homéostasie cellulaire, en éliminant les protéines mal repliées ainsi que les organites endommagés (335). Le rôle de l'autophagie dans la réponse aux RI est à double tranchant, avec des études montrant son rôle anti-tumoral (336) et d'autres son rôle pro-tumoral (337). Dans les cellules tumorales mammaires et colorectales, il a été montré que l'induction de la mort cellulaire par autophagie, permet de basculer l'effet cytoprotecteur autophagique dépendant de p53 vers un effet cytotoxique (338,339). Par ailleurs, la mort cellulaire par autophagie peut être bloquée par l'inhibition pharmacologique ou génétique de la fonction autophagique. Il a été montré que la protéine autophagique ATG5 est impliquée dans l'induction de la mort cellulaire autophagique induite par les RI (340). De plus, cette mort cellulaire de type II est activée dans les cellules incapables d'apoptose et conduit à une réponse anti-tumorale aux RI (341). L'autophagie induite par les RI contribue ainsi à l'élimination des cellules tumorales, par l'induction de la mort cellulaire autophagique.

La nécrose et la nécroptose se définissent comme des morts cellulaires de type III, induites par les RI. La nécrose est un mode de mort cellulaire incontrôlée, exécutée en réponse à des conditions défavorables. Or, dans les cellules cancéreuses anaplasiques de la thyroïde et de la corticosurrénale (342), il a été montré la capacité des RI à induire une nécrose programmée . Dans ce cas, la nécrose peut être régulée par des récepteurs de mort (Fas, TRAIL) ou lorsque l'apoptose est inhibée, on parle alors de « nécroptose » (343). Ces deux morts se caractérisent par un gonflement des organites, une rupture de la membrane plasmique, une perte des composants intracellulaire, le tout menant à la lyse de la cellule (330). De faibles doses de RI induisent généralement la mort cellulaire par l'induction de l'apoptose, tandis que de fortes doses mènent à la nécrose dans un modèle d'ostéosarcome (344).

2.2.3.1.2. Processus de mort cellulaire atypique

La mort cellulaire induite par les RI implique également des modalités de mort cellulaire atypique, comprenant la catastrophe mitotique, l'entose et le cannibalisme cellulaire.

La catastrophe mitotique résulte d'une mitose aberrante. Il s'agit d'un mécanisme par lequel les cellules entrent prématurément ou de manière inappropriée en mitose, menant à la mort cellulaire et qui peut être induite par les RI (345). En effet, une grande majorité des cellules tumorales sont mutées pour p53 et ne peuvent ainsi pas activer de manière efficace les points de contrôle du cycle cellulaire afin d'initier l'arrêt du cycle et de procéder à la réparation de l'ADN à la suite des RI. En conséquence, les cellules entrent en l'état en mitose et subissent la catastrophe mitotique (346). Enfin, les cellules subissant cette mort cellulaire atypique peuvent mourir d'apoptose ou de nécrose retardées ou encore entrer en sénescence (347), remettant ainsi en question la qualité de modalité de mort cellulaire finale de la catastrophe mitotique.

L'entose se définit par l'invasion d'une cellule vivante dans une autre cellule non phagocytaire. Le cannibalisme cellulaire, quant à lui, est un processus au cours duquel une cellule vivante engloutit une autre cellule vivante. Ces deux processus correspondent à des processus de mort cellulaire, formant des structures homotypiques, dites « cellule dans une cellule » (348). Une fois ingérée, la cellule internalisée meurt par dégradation lysosomale dépendante de l'autophagie de la cellule cible (349). Lorsque l'autophagie n'est pas fonctionnelle, les cellules peuvent être dégradées par apoptose (349). Dans de nombreux types de cancers, la structure « cellule dans une cellule » est retrouvée (350), pouvant être associée à un bon pronostic (e.g. cancer du sein (351)) ou un mauvais pronostic (e.g. cancer du pancréas (352)). De plus, Martins et *al*. ont précédemment montré le rôle de la RT dans l'induction de l'entose (353). L'implication de ces morts cellulaires dans la progression tumorale reste à être définie plus clairement.

2.2.3.1.3. Sénescence

Outres les modalités canoniques de mort cellulaire décrites, la sénescence cellulaire peut aussi être induite et contribuer à l'élimination des cellules tumorales après RT, selon la dose et le type cellulaire. L'accumulation des dommages à l'ADN déclenche l'arrêt du cycle cellulaire et contribuent à la sénescence (354). Les cellules arrêtent de proliférer. Il s'agit d'un processus actif et maintenu par des voies dépendantes de p53/p21 ou p16 (309). Les cellules sénescentes sont caractérisées par une augmentation de l'activité de la β-galactosidase et la sécrétion du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Une fois sécrété, le SASP (e.g. IL-1β, IL-6, IL-8, CXCL1, VEGF, TGF-β) est impliqué dans l'induction d'activités bénéfiques ou nocives (309). Des rôles ambivalents ont été décrits pour la sénescence associée à la RT, dans le cancer pulmonaire la sénescence augmente la radiosensibilité (355) et au contraire favorise la radiorésistance dans le carcinome de la tête et du cou (356).

2.2.3.2. Effets non ciblés des rayonnements ionisants

2.2.3.2.1. Effet abscopal

Historiquement, l'efficacité de la RT a été décrite comme résultant des effets cytotoxiques au niveau de la zone irradiée. Cependant, plusieurs cas ont démontré un effet anti-tumoral à distance de la zone irradiée. Abscopal se définissant comme « à distance du volume irradié mais dans le même organisme », cet effet à distance a été nommé effet abscopal en 1953 par R. H. Mole (357).

Brièvement, après irradiation des cellules tumorales, l'antigène spécifique de la tumeur est reconnu par les cellules présentatrices de l'antigène, telles que les cellules dendritiques. Ces dernières migrent vers les ganglions lymphatiques et activent les lymphocytes T $CD8^+$, qui acquièrent la capacité de se différencier en lymphocytes T cytotoxiques. Ces cellules T activées sont capables de migrer vers les sites tumoraux situés dans les champs irradiés et non irradiés, et d'éliminer les cellules tumorales, conduisant ainsi à une réponse anti-tumorale locale et systémique (358).

Associé à la RT seule, quelques cas ont été rapportés chez les patients irradiés dans de nombreux types de tumeurs : une revue systématique de 2016 a rapporté 46 cas totaux entre 1969 et 2014 (359), une autre a rapporté 51 cas entre 1973 et 2019 (360). Par exemple, Okuma et *al*. ont observé pour le cas d'un homme traité par RI dans le cadre d'un carcinome hépatocellulaire, une régression tumorale au niveau des sites métastatiques pulmonaires non irradiés (361). Ces dernières années, avec la découverte des immunothérapies, la combinaison de la RT avec les inhibiteurs des checkpoints immunitaires (ICB) a permis une augmentation de l'incidence des effets abscopaux. En effet, les ICB potentialisent la réponse des cellules T, en levant un mécanisme responsable de leur inhibition. Les résultats de plusieurs essais cliniques ont confirmé que lors de cette combinaison RI + ICB, l'effet abscopal est observé chez 30% des patients (362).

2.2.3.2.2. Effet bystander

L'effet « bystander » (spectateur en anglais) désigne ainsi les effets sur les cellules non irradiées, situées à proximité des cellules irradiées (363). Cet effet décrit la conséquence radiobiologique d'une communication locale entre ces cellules, qui peut être médiée de manière directe ou indirecte. D'une part, de manière directe, la production de ROS induite par les RI et issue des cellules irradiées peut affecter les cellules non irradiées. La communication locale peut également s'établir par des jonctions cellulaires directes entre cellules irradiées ou non (363). D'autre part, de manière indirecte, ces communications intercellulaires peuvent se produire par la production par les cellules irradiées de facteurs solubles, tels que TGF-β, IL-8, le ligand de mort FasL ou encore les exosomes (363). Un test d'analyse de la mort cellulaire, utilisant la cytométrie en flux d'imagerie multispectrale a été développé par notre équipe. Il a été révélé la capacité des deux types de cellules à subir soit une mort cellulaire directe (cellules irradiées) ou soit des effets létaux bystander (cellules non traitées) à la suite d'une irradiation

(353).

De plus, les cellules de proximité en plus de répondre aux signaux des cellules irradiées, peuvent également influencer à leur tour ces dernières, suggérant ainsi un dialogue réciproque, qui module les réponses aux RI (364) Selon la dose et le type de RI, la signalisation de proximité peut soit induire la mort cellulaire (par des dommages à l'ADN et une instabilité génomique) ou soit une survie accrue (365).

2.2.3.3. Les conséquences immunologiques des radiations ionisantes

En plus de son rôle cytotoxique direct, la RT induit également des fonctions immunologiques, permettant de stimuler le système immunitaire contre les tumeurs.

2.2.3.3.1. Mort cellulaire radio-induite immunogène

La mort cellulaire immunogène (ICD) est un type de mort cellulaire régulée, pouvant être induite par divers facteurs de stress cellulaire (366). Plusieurs études ont suggéré le rôle de la RT dans l'induction de l'ICD et l'influence de la dose, le type de rayonnement et le fractionnement de l'irradiation sur l'ICD, on parle ainsi d'ICD radio-induite (367).

L'ICD déclenche une réponse immunitaire anti-tumorale, médiée par les lymphocytes T $CD8^+$, à la suite de la libération ou l'exposition de DAMPs. La RT par l'induction d'un stress cellulaire, principalement médié par les ROS, conduit à la libération de plusieurs DAMPs. Ces derniers peuvent impliquer des signaux « find-me » tels que l'adénosine triphosphate (ATP) et l'HMGB1 (*high-mobility group box 1*), ou des signaux « eat-me » tels que la calréticuline (CRT) et les protéines de choc thermiques (HSP). Ces signaux de danger sont reconnus par les PRRs au niveau des CPA, notamment les cellules dendritiques, qui sont ainsi recrutés au niveau tumoral. L'activation des DCs se traduit par l'ingestion des cellules tumorales et l'exposition des antigènes tumoraux à leur surface. Il s'en suit leur migration vers les ganglions lymphatiques, afin d'amorcer les cellules T $CD8^+$ naïves spécifiques de la tumeur, qui vont induire l'apoptose des cellules tumorales (367).

Selon la nature du signal de danger, trois processus associés à l'induction de l'ICD au niveau tumoral ont été identifiés en réponse à la RT. Premièrement, <u>l'exposition pré-apoptotique de la calréticuline (CRT)</u> à la surface des cellules cancéreuses mourantes est induite à la suite d'un stress du réticulum endoplasmique. Elle engendre des effets pro-phagocytaires : la CRT se lie au récepteur CD91 des CPA et améliore l'absorption des antigènes associés à la tumeur et l'induction de la cytotoxicité des cellules T $CD8^+$ (368,369). D'autre part, <u>la libération post-mortem de la protéine nucléaire HMGB1</u> dans l'espace extracellulaire permet sa reconnaissance par le récepteur TLR4. L'interaction HMGB1-TLR4 stimule la libération de cytokines pro-inflammatoires et active la présentation croisée optimale des antigènes aux lymphocytes T (370). Il est à noter qu'une sécrétion chronique d'HMGB1 peut au contraire induire une

inflammation chronique immunosuppressive et être responsable d'une radio-résistance (371). Enfin, la libération d'ATP par les cellules mourantes est impliquée dans l'induction de l'ICD. Elle est médiée par des mécanismes distincts, tels que l'autophagie, l'exocytose lysosomale, l'apoptose et la perméabilisation de la membrane plasmique (372). Premièrement l'autophagie pré-mortem facilite la libération d'ATP, via l'exocytose lysosomale dépendante de la protéine lysosomale LAMP1 (373). Cette dernière transite vers la membrane plasmique d'une manière strictement dépendante des caspases. De plus, les caspases induisent aussi l'ouverture des canaux de la pannexine 1 (Panx1) au cours de l'apoptose, pouvant libérer l'ATP. Les canaux de Panx1 sont également nécessaires à la translocation de LAMP1 vers la membrane plasmique (372). Enfin, les caspases et l'expression de Panx1 sont essentielles à l'augmentation partielle de perméabilité membranaire précédant la rupture complète de la membrane plasmique post-apoptose, médiée par l'activation de la protéine kinase ROCK-1 (372). L'ensemble de ces mécanismes permet la libération de l'ATP (**Figure 20**), qui peut alors se lier à ses récepteurs, les récepteurs purinergiques. L'ATP peut d'une part, se lier au récepteur métabotropique P2Y2 et agir comme un chimioattractant des CPA et stimuler leur maturation (367). D'autre part, l'ATP peut aussi se lier au récepteur ionotropique P2X7 des CPA et conduire à l'activation de l'inflammasome NLRP3. En conséquence de cette activation, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β sont libérées et conduisent à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (374). L'activation de ces récepteurs purinergiques sera détaillée ultérieurement.

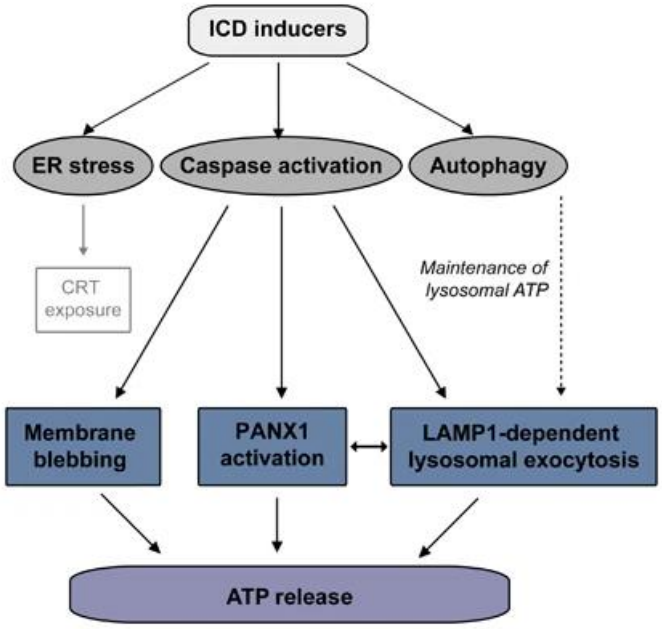


Figure 20 - Schéma des mécanismes moléculaires de la sécrétion d'ATP durant la mort cellulaire immunogène (372).

Enfin récemment, l'ICD radio-induite a aussi été associé à un mécanisme d'induction d'une réponse interféron de type I, déclenché par la libération d'ADN cytosolique par les RI.

2.2.3.3.2. Réponse cellulaire immunostimulatrice (cGAS-STING-IFN type I)

La RT induit la sécrétion cytosolique d'ADN, soit par la rupture des micronoyaux ou soit par la fuite au niveau mitochondrial, tous deux dépendants des effets directs ou indirects des RI. En présence de cet ADN cytosolique et afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, les cellules utilisent des capteurs d'ADN, capables de reconnaitre les acides nucléiques et d'activer les voies de signalisation en aval. En conséquence cela entraîne des réponses inflammatoires et l'activation de réponses immunitaires. Parmi les capteurs d'acides nucléiques, les PRRs au niveau intracellulaire, tels que les TLR3/7/8 et 9 peuvent être cités, ainsi que les récepteurs RIG-1 like reconnaissant l'ARN cytoplasmique ou encore la guanosine monophosphate – adénosine monophosphate cyclique (GMP-AMP cyclique) synthase (cGAS) reconnaissant l'ADN cytoplasmique (375). Cette dernière régit à ce jour l'une des principales voies de médiation de la réponse immunitaire à l'ADN, que nous allons détailler.

En réponse à la détection d'ADN cytosolique, cGAS interagit avec l'ADN, préférentiellement double-brin, et subit des changements de conformation, déclenchant son activité enzymatique par exposition de sa poche catalytique (376). La forme active de cGAS catalyse l'ATP avec la guanosine triphosphate (GTP) et forme le second messager cGAMP (377). Ce dernier se lie ensuite à la protéine adaptatrice STING, située à la membrane du réticulum endoplasmique et induit son activation (378). Les changements de conformation de STING, une fois activé par cGAMP, induisent sa translocation du RE vers le Golgi, à travers le compartiment intermédiaire RE-Golgi. A ce niveau, STING se lie à la protéine TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) et le complexe STING-TBK1 qui en résulte, permet à TBK1 de phosphoryler STING (379). Par la suite, STING phosphorylé se lie au facteur IRF3 et induit son recrutement pour sa phosphorylation et son activation par TBK1 (380). Le facteur de transcription IRF3, ainsi activé, se dimérise et se déplace vers le noyau et exerce sa fonction transcriptionnelle sur le gène de l'interféron de type I (IFN-I), codant pour l'interféron-β (381). En parallèle, STING active également IKK, qui en retour induit la phosphorylation de la protéine IκB et libère par conséquent le facteur de transcription NF-κB. La translocation nucléaire de ce dernier induit la transcription des gènes codant pour les cytokines inflammatoires (382) (**Figure 21**).

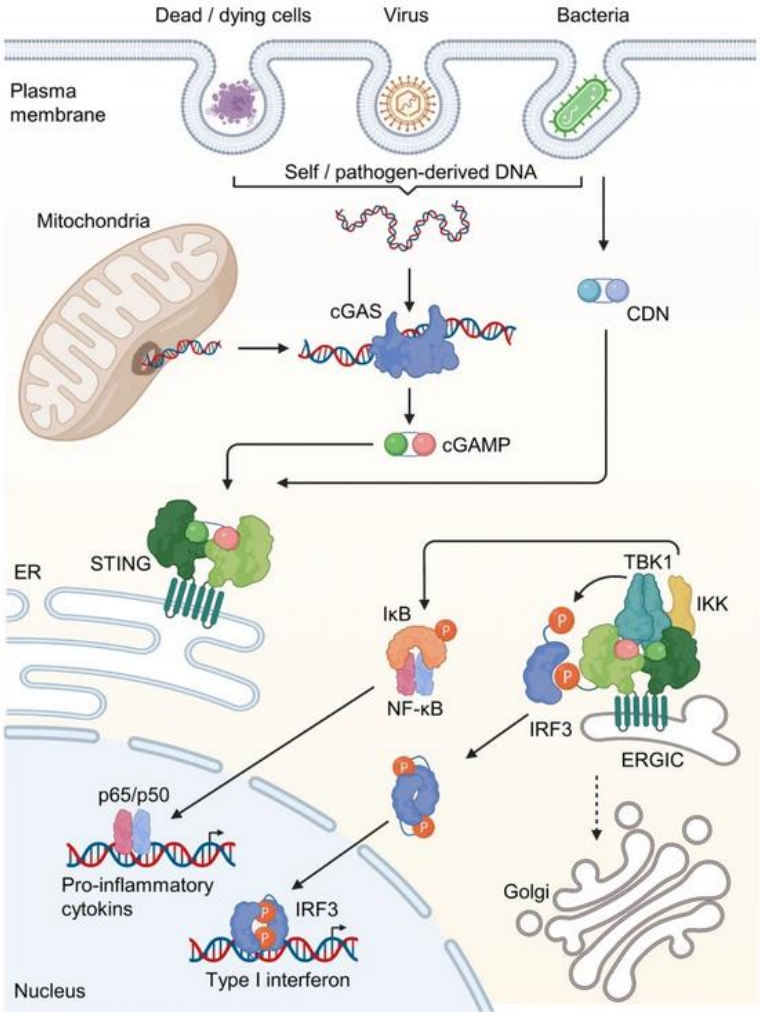


Figure 21 - Vue d'ensemble de la voie de signalisation cGAS/STING.
Les microbes ou les virus à ADN peuvent introduire de l'ADN étranger dans le cytosol. La perméabilisation du compartiment nucléaire ou mitochondrial induit la libération cytosolique d'ADN propre à l'organisme. L'ensemble peut déclencher la voie de signalisation cGAS/STING (383).

En résumé, la voie cGAS/STING permet l'initiation de réponses immunitaires innées par la détection de l'ADN cytosolique double brin et la sécrétion subséquente d'IFN-I. Cette dernière induit la maturation des DC et leur capacité à activer les lymphocytes T $CD8^+$, qui par leur activité cytotoxique éliminent les cellules tumorales. Les DC et les macrophages peuvent aussi déclencher la voie cGAS/STING de manière intrinsèque soit par ingestion de l'ADN tumoral, encapsulé dans des exosomes ou libéré par les cellules tumorales éliminées ou soit par transfert de cGAMP par l'intermédiaire de jonctions gap. En conséquence, ces CPA induisent la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, l'ensemble permettant d'améliorer les fonctions anti-tumorales effectrices. Enfin, la sécrétion d'IFN-I peut aussi inhiber les cellules Treg (384).

Dans un contexte de RT, il a été montré que les micronoyaux et l'ADNmt induits par les RI, activent la voie de signalisation cGAS/STING, ce qui permet l'induction d'une réponse

immunitaire anti-tumorale induite par la RT (385,386). Deng et *al*. ont montré que l'inhibition de STING ou de cGAS au niveau des DC, réprime la production d'IFN-I et l'activation des cellules T CD8 après RT (385). D'autres études ont montré le rôle nécessaire de l'IFN-I dans l'induction de la réponse anti-tumorale à la RT (387,388). L'ensemble souligne la nécessité de l'activation de cGAS/STING et d'une réponse IFN-I pour une activité anti-tumorale induite par les RI.

De plus, il est à noter que Vanpouille-Box et *al*. ont montré que l'ADN s'accumule dans le cytosol jusqu'à une certaine dose de RI (12-18Gy), au-delà l'expression de TREX1, nucléase de l'ADN dégradant l'ADN cytosolique, est augmentée et induit son élimination. Ils ont démontré sur des lignées tumorales mammaires (TSA), que la dégradation de l'ADN cytosolique à 12Gy empêche l'activation de cGAS, l'induction de l'IFN-I et abolit la réponse immunitaire anti-tumorale induite par la RT (389). L'implication de la dose de RI, dans l'induction de l'immunogénicité de la RT doit ainsi être plus étudiée.

Enfin, brièvement, dans des contextes particuliers, l'activation chronique de la voie cGAS/STING peut paradoxalement faciliter la progression tumorale et la radiorésistance lorsqu'elle est induite par la RT (390,391). Par exemple, Liang et *al*. ont démontré que l'activation de STING par la RT, recrute les cellules myéloïdes suppressives, inhibant la fonction des cellules T et réduisant la sensibilité aux RI dans un modèle de lignée d'adénocarcinome colorectal (MC38) (392). Chen et *al*. ont quant à eux montré que l'IFN-I post-RI sécrète l'indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), diminuant le ratio cellules T $CD8^+$ par rapport aux cellules immunosuppressives Treg (393). Enfin, Zheng et *al*. ont décrit dans un modèle cellulaire de cancer du sein (4T1) que l'irradiation induit des métastases pulmonaires par l'activation de la voie cGAS-STING médiée par la sécrétion de CCL5 par les cellules stromales mésenchymateuses (394).

2.2.3.3.3. Effets sur le microenvironnement tumoral

Premièrement, les RI peuvent agir au <u>niveau endothélial</u>. Les RI peuvent être à l'origine d'une dysfonction endothéliale, se caractérisant par une perméabilité accrue, un détachement de la membrane basale sous-jacente et l'apoptose des cellules endothéliales, ce qui peut conduire à la destruction vasculaire tumorale, entraînant indirectement la mort des cellules cancéreuses (395). Selon la dose et le régime de fractionnement, la RT n'exerce pas le même effet sur le système vasculaire (396). De fortes doses uniques d'irradiation (>10Gy) induisent la destruction vasculaire (397), pouvant potentialiser l'hypoxie, facteur de résistance tumorale (398). Au contraire, une dose plus faible induit des dommages endothéliaux modérés, qui peuvent augmenter la vascularisation de la tumeur (399). De plus, la RT permet aussi le recrutement de cellules immunitaires innées par l'expression accrue de molécules d'adhésion vasculaires (ICAM1 et VCAM1) (400,401).

La RT interagit également au <u>niveau stromal</u>. Il a été montré qu'après RT, les CAFs adoptent un état favorisant la croissance tumorale par la modulation de l'expression de collagène, des

MMP et d'autres composants de la ECM ainsi que la sécrétion de facteurs de croissance (402). Li et *al*. ont aussi montré qu'après une exposition à 4Gy, les CAFs sécrètent CXCL12 et IL-6, qui induisent l'EMT des cellules cancéreuses pancréatiques (403). Enfin les CAFs ont largement été décrits comme des cellules suppressives des réponses immunitaires innées et adaptatives. Par exemple, leur sécrétion de TGF-β, à la suite des RI, permet de réduire l'activation des DC et la cytotoxicité des cellules T CD8+ et d'induire l'activation des cellules Treg (402). Berzhagi et *al*. ont de leur côté montré que les CAFs réorientent les TAMs vers un phénotype immunosuppresseur (404).

Enfin, la RT affecte également les cellules immunitaires. Après RT, le recrutement de cellules immunitaires circulantes affecte le TME, en réamorçant une réponse immunitaire adaptative. Par exemple, la radiothérapie par le biais de l'ICD et la production d'IFN-I par la voie cGAS/STING permet le recrutement des DC et la présentation des antigènes tumoraux, induisant l'activité cytotoxique des T $CD8^+$ (367,391). De plus, la RT par la sécrétion de CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL16 permet le recrutement de cellules T $CD8^+$ (405). La RT induit l'expression du CMH-I, Fas et NKG2DL au niveau des cellules tumorales, afin de faciliter leur élimination par les cellules T $CD8^+$ (406–408). L'interaction de NKG2DL avec son récepteur (NKG2D) stimule la formation de synapses immunitaires, favorisant l'activation des T $CD8^+$ cytotoxiques et des NK (407) (**Figure 22**). La RT active aussi les cellules T par la surexpression des molécules de co-stimulation (CD80) (409). Mais la RT reste potentiellement limitée par le recrutement de cellules immunitaires suppressives, tels que les Treg, les cellules myéloïdes suppressives et les neutrophiles. Par exemple, ces derniers sont recrutés au niveau du TME radio-induit, par la sécrétion de chimioattractants tels que CXCL1, CXCL2 et CCL5. Shinde-Jadhav et *al*. ont montré dans un modèle de tumeur de la vessie que les neutrophiles ainsi activés forment des pièges extracellulaires issus des neutrophiles (NETs), qui au sein du TME bloque l'infiltration des T $CD8^+$, favorisant ainsi la radiorésistance (410). Cependant, le rôle de ces neutrophiles associés aux tumeurs (TANs) est discuté puisque d'autres études démontrent leur rôle anti-tumoral par la production de ROS (411). Tout comme les TAMs, les fonctions des TANs semblent dépendre de leur environnement. Par ailleurs, la RT par l'induction de la mort de cellules tumorales, conduit à la sécrétion de signaux danger qui vont moduler le système immunitaire. L'ATP et l'adénosine font partie de ces signaux et possèdent un rôle immunosuppresseur sur le TME (411), qui sera détaillé ultérieurement. Enfin, concernant les TAMs, la modulation de leur activation par la RT est discutée dans la littérature et fait l'objet de la partie suivante. La **Figure 22** résume quelques exemples de la modulation du TME par la RT.

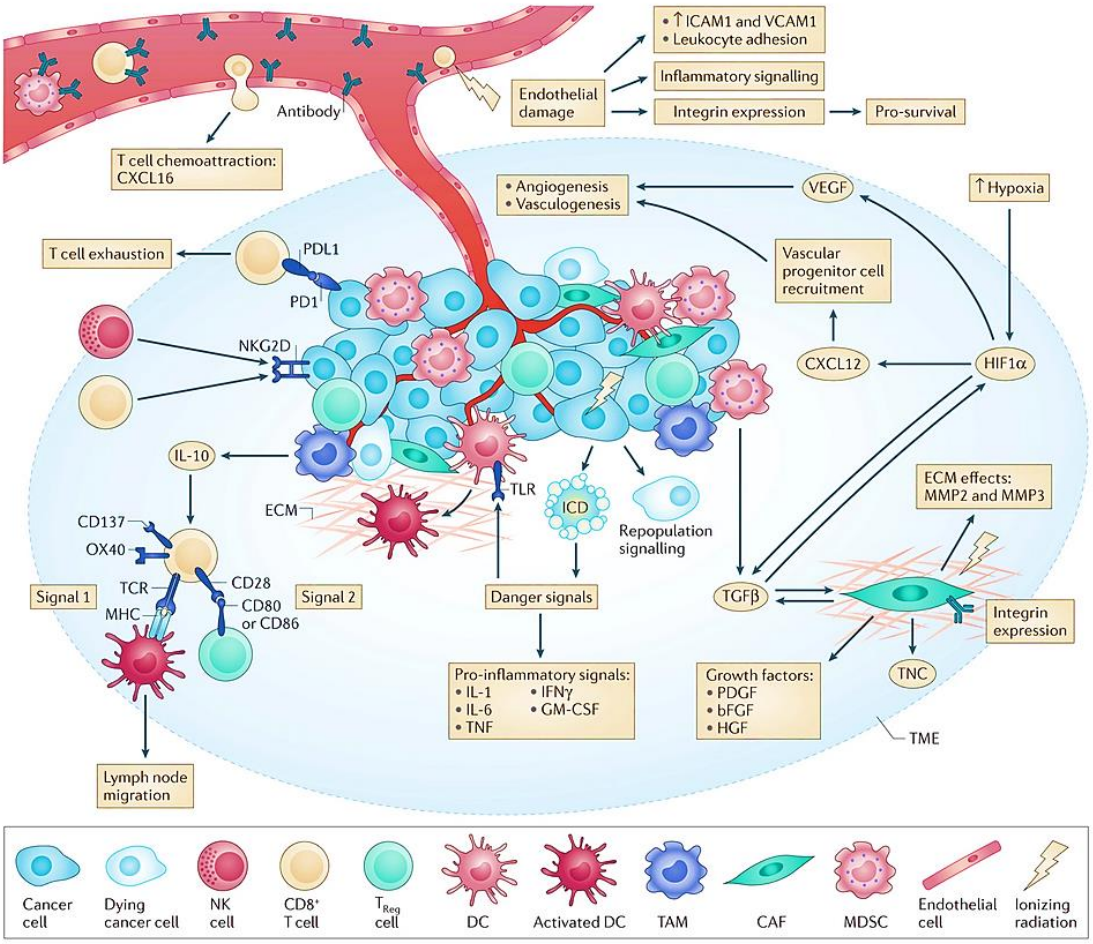


Figure 22 - Effet de la RT sur le microenvironnement tumoral.
bFGF : *basic fibroblast growth factor* ; GM-CSF : *granulocyte–macrophage colony-stimulating factor* ; HGF : facteur de croissance des hépatocytes ; ICD : mort cellulaire immunogène ; IFNγ : interféron-γ ; MHC : complexe majeur d'histocompatibilité ; MMP : métalloprotéinase matricielle ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; TAMs : macrophages associés aux tumeurs ; TCR : récepteur des cellules T ; TNC : tenascine C ; TNF : *tumour necrosis factor* (412).

2.3. Les effets de la RT sur la reprogrammation fonctionnelle des macrophages

La RT induit un fort recrutement de macrophages dérivées de monocytes au niveau du TME irradié. En effet, la RT a été associée avec une sécrétion élevée de la chimiokine CCL2 et de la cytokine CSF-1, toutes deux connues pour induire le recrutement de macrophages (413). Meng et *al*. ont montré, dans un modèle de mélanome murin, que la déplétion des TAMs avant l'irradiation, permet d'augmenter les effets anti-tumoraux de la RT (414). De manière similaire, Stafford et *al*. ont démontré que l'inhibition du récepteur CSF-1, bloque le recrutement de TAMs après RT et augmente ainsi la survie et retarde la récurrence du glioblastome dans un modèle de xénogreffe intracrânienne (415). Ces résultats mettent en avant le rôle principalement immunosuppresseur des TAMs. En revanche, Klug et *al*., ont rapporté, dans un

modèle de tumeur pancréatique, qu'une irradiation de 2Gy induit un changement phénotypique des TAMs, nécessaire au recrutement et à la fonction anti-tumorale des cellules T $CD8^+$ (274).

2.3.1. Modulation d'induction de l'activation radio-induite des macrophages

Comme décrit précédemment, la RT a la capacité de moduler l'état d'activation des TAMs au sein du TME. Cependant, la question concernant les conditions de la modulation de cette plasticité et du développement d'un phénotype protumoral ou anti-tumoral sont très discutées dans la littérature. Il apparaît selon la dose d'irradiation (rayons X et γ), différents effets de la RT sur la polarisation des TAMs (416). Premièrement, de fortes doses d'irradiation (>10Gy) ont été associées à l'acquisition d'un phénotype pro-tumoral des TAMs (417–419). Par exemple, une étude sur un modèle murin de tumeur pancréatique, a décrit une infiltration importante de TAMs après la RT à forte dose (12Gy ou 3x6Gy), présentant un profil immunosuppresseur des cellules T, notamment par la surexpression du ligand PDL-1 au niveau des TAMs (418). Une autre étude menée par Okubo et *al.* a montré sur un modèle murin de cancer oral, que les macrophages irradiés à de fortes doses de RI (12Gy) présentent des propriétés pro-angiogéniques, contribuant à la néoangiogenèse et favorisant ainsi la croissance tumorale (419). Deuxièmement, de même que les fortes doses, des doses d'irradiation faibles (<1Gy) ont également été décrites comme induisant un phénotype pro-tumoral des TAMs. Des études *in vitro* ont révélé la diminution du niveau d'iNOS et la production de NO dans des RAW264.7 macrophages pro-inflammatoires irradiés à faible dose, induisant ainsi la reprogrammation de ces macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (420). De manière similaire, l'irradiation (0,5Gy) de macrophages RAW264.7 activés par le LPS, entraîne aussi une diminution de la production de TNF-α (421). En outre, Lodermann et *al.* ont aussi montré que de faibles doses de rayons X (0,5 – 0,7Gy) induisent un phénotype anti-inflammatoire dans les cellules humaines THP-1 activées par le LPS, caractérisées par une sécrétion réduite d'IL-1β (422). Enfin, au contraire des doses fortes et faibles d'irradiation, les doses intermédiaires (entre 1 et 10Gy) sont décrites, dans la littérature, comme induisant principalement un phénotype anti-tumoral (274,423,424). Par exemple, les travaux de notre équipe ont montré sur plusieurs modèles *in vitro* de macrophages (PMA-THP1, macrophages dérivés de monocytes humains (hMDMs) ou encore des macrophages murins RAW264.7), que l'irradiation à dose modérée (2Gy) induit l'expression d'un profil pro-inflammatoire des macrophages (424). Il a également été décrit que l'irradiation de 2Gy de macrophages murins réduit leur capacité à induire la prolifération de cellules T *in vitro* (425). De même, l'irradiation par rayons γ (2Gy) d'une lignée cellulaire de macrophages humains (U937) induit une expression plus élevée de TNF-α et d'IFN-γ en comparaison aux macrophages non irradiés (426). Ces trois dernières études montrent les macrophages irradiés par des doses intermédiaires de manière *in vitro* ont tendance à présenter des caractéristiques pro-inflammatoires. Ces effets ainsi observés *in vitro*, ont été confirmés par l'étude *in vivo* de Klug et *al.*, décrite plus haut, démontrant qu'une irradiation de 2Gy favorise la capacité des macrophages irradiés à inhiber l'angiogenèse

tumorale et à promouvoir la réponse des cellules T (274). Dans l'ensemble, les fortes et faibles doses d'irradiation ne semblent pas affecter le phénotype des macrophages vers un phénotype anti-tumoral, au contraire des doses intermédiaires d'irradiation. Néanmoins, la plupart des études citées ont été menées *in vitro*, sur des macrophages seuls sans contact avec un TME et révèlent ainsi l'effet direct de la RT sur les macrophages. Des études *in* vivo devraient également permettre d'apprécier l'effet de la RT sur les macrophages dans un environnement plus complexe.

La polarisation des TAMs peut aussi être fortement influencée par son TME après RT. Par exemple, de fortes doses d'irradiation induisent un environnement hypoxique, dans lequel les cellules tumorales sécrètent du CCL2, CCL5 et CXCL12 pour recruter les macrophages et induire un TME immunosuppresseur (427). Le contexte hypoxique conduit aussi à une hausse d'expression de PD-L1 sur les TAMs, dépendante de HIF-1, qui inhibe alors la réponse immunitaire anti-tumorale (428). Une récente étude a démontré que le facteur VEGF-A, aussi régulé par le facteur HIF, impacte le recrutement des macrophages et leur polarisation vers un phénotype immunosuppresseur (429). Les fragments de la ECM obtenus post-dégradation sont connus pour représenter des ligands des récepteurs TLRs des macrophages (430). En particulier l'acide hyaluronique, libéré après irradiation, interagit avec son récepteur CD44 situé à la surface des macrophages. Les macrophages ainsi recrutés présentent un phénotype immunosuppresseur, notamment par l'expression de l'IL-10 (431). Enfin, la sécrétion de TGF-β par les CAFs radio-induits, peut aussi influencer l'activation des macrophages. Il a été montré qu'après irradiation, les CAFs inhibent la capacité migratoire ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires des TAMs, en favorisant alors un phénotype immunosuppresseur (404).

L'activation radio-induite des macrophages dépend donc à la fois de la dose d'irradiation reçue par le macrophage mais également du microenvironnement dans lequel il se trouve. La modulation de ces deux facteurs doit être précisée selon les caractéristiques fonctionnelles initiales et radio-induites des macrophages.

2.3.2. Voies de signalisation impliquées

Différentes voies de signalisation ont été proposées afin d'expliquer les effets de l'irradiation sur la polarisation des TAMs, telles que la voie NF-κB, les voies de dommages à l'ADN et la phosphorylation des MAPK.

2.3.2.1. La voie NF-κB

La voie NF-κB est connue pour moduler la polarisation des macrophages, notamment en fonction de sa structure homo- ou hétérodimérique et selon les sous-unités engagées. Plusieurs études ont notamment décrit le rôle important de l'hétérodimère p65-p50 de NF-κB dans la polarisation anti-tumorale des macrophages, après irradiation (420,432). Une fois que

cet hétérodimère p65-p50 NF-κB est transloqué dans le noyau, il permet l'expression de plusieurs médiateurs inflammatoires, tels que le TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, IFNγ, CXCL10 et iNOS (433). Au contraire, l'homodimère p50-p50 NF-κB a été caractérisé comme inhibant l'expression de ces gènes (422,434). En outre, les différences de structure du facteur de transcription NF-κB sont également associées à la dose d'irradiation. En effet Crittenden et *al.* ont révélé qu'une forte dose d'irradiation (60Gy) active le dimère p50-p50 NF-κB et entraîne une production ultérieure d'IL-10 (434). De manière similaire, il a été montré qu'une faible dose d'irradiation (<1Gy) réduit la translocation nucléaire de l'hétérodimère p50-p65 NF-κB, dans les macrophages humains activés par LPS. Cela a également été corrélé à une diminution de la sécrétion de l'IL-1β (422). A l'inverse, Hildebrandt et *al.* ont mis en évidence une expression élevée de la sous-unité p65 de NF-κB après irradiation γ (2Gy) des macrophages RAW264.7, induisant l'expression de gènes inflammatoires dans ces macrophages irradiés (420). Dans l'ensemble, ces études démontrent selon l'expression de l'homo- (p50-p50) ou l'hétérodimère (p65-p50) de NF-κB, la polarisation induite par la RT diffère, le premier induit par des faibles et fortes doses de RI et amenant à un phénotype pro-tumoral tandis que le second fait suite à des doses intermédiaires d'irradiation et favorise un phénotype anti-tumoral des TAMs.

2.3.2.2. La kinase ATM

La signalisation de NF-κB induite par la RT peut être renforcée, à la suite de dommages à l'ADN et notamment l'activation de la kinase ATM. En effet, l'activation d'ATM faisant suite aux dommages à l'ADN radio-induits, conduit à l'ubiquitination de la protéine NEMO (modulateur essentiel de NF-κB). La NEMO ainsi ubiquitinylée, ubiquitine à son tour l'inhibiteur Ikβ et entraine la dégradation de ce dernier par le protéasome, ce qui libère l'hétérodimère p65-p50 NF-κB dans le cytoplasme et permet sa translocation dans le noyau afin d'agir comme activateur transcriptionnel (435). Parker et *al.* ont montré qu'après une irradiation (2Gy), la phosphorylation de NEMO suivie par l'activation du facteur de transcription NF-κB. L'ensemble engendre une augmentation d'expression des CMH-II, des cytokines TNF-α et IFNγ ainsi que des molécules de co-stimulation des cellules T (CD86) au niveau des macrophages irradiés, leur permettant d'adopter un phénotype plutôt immunostimulateur (426).

De plus, notre équipe a également mis en avant une voie de signalisation radio-induite impliquant la kinase ATM, modulant le phénotype des macrophages. Ils ont montré que la production de ROS dépendante de NOX2, induit des dommages à l'ADN. Les lésions ainsi induites par les ROS activent la kinase ATM, qui permet la régulation du facteur de transcription IRF5. L'activation de cette voie dans les macrophages irradiés à 2 Gy, permet leur polarisation vers un phénotype pro-inflammatoire induit par la RT. De plus, il est important de noter que l'expression accrue de cette voie a été observée dans des biopsies de patients atteints de cancer du rectum et ayant bien répondu à la RT néoadjuvante (424).

2.3.2.3. La voie des MAPK

Les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) sont des sérine-thréonine kinases, comprenant les kinases 1 et 2 régulées par le signal extracellulaire (ERK1/2), JNK (kinase JUN N-terminale) et p38. La phosphorylation des MAPK par les MAPK kinases (MAPKK) permet leur activation, tandis que la déphosphorylation des MAPK par la MAPK phosphatase (MKP-1) induit leur inactivation. Les MAPK régulent diverses voies cellulaires allant de la prolifération, la différenciation cellulaire à l'apoptose (436). En outre, il a été montré que l'activation des MAPK permet la transcription des gènes pro-inflammatoires, corrélée à une activation pro-inflammatoire des macrophages. Il en est de même pour l'inhibition ou la déplétion de MKP-1 (437).

Dans un contexte d'irradiation, les ROS produits peuvent activer les MAPK des macrophages irradiés (438). Tsukimoto et *al*. ont montré que l'irradiation par de faibles doses de rayons γ (0,5 et 1Gy) induit une déphosphorylation des ERK1/2 et des MAPK p38, dépendante de MKP-1. Il s'en suit alors la suppression de la production de TNF-α dans les RAW24.7 macrophages irradiés (421). A l'inverse, une autre étude a montré la phosphorylation accrue de ERK1/2 et de p38 après une irradiation γ de 2Gy, associée cette fois-ci à une production importante de TNF-α au sein des macrophages irradiés (439).

Pour conclure, la RT permet de moduler l'activation des macrophages, en fonction de la dose d'irradiation mais également du TME, afin notamment d'améliorer le contrôle de la réponse anti-tumorale. Diverses voies de signalisation sont impliquées dans cette polarisation radio-induite des macrophages. Poursuivre la caractérisation des mécanismes cellulaires impliqués nous semble primordial afin de mettre en lumière de nouvelles cibles cellulaires pouvant être combinées avec la RT dans le but d'améliorer l'efficacité de la RT.

2.4. Les cibles d'intérêt pour potentialiser la reprogrammation radio-induite des macrophages

Bien que la plasticité des macrophages en réponse aux radiations ionisantes et au TME puisse induire une réponse immunitaire anti-tumorale, il semble que la RT seule ne soit pas suffisante pour observer cette réponse *in vivo* (274). La RT semble avoir besoin d'être combinée à d'autres cibles thérapeutiques afin d'induire une reprogrammation effectrice des TAMs et permettre une réponse immunitaire anti-tumorale complète.

2.4.1. Les cibles d'intérêt principales

Parmi, les cibles d'intérêt, qui peuvent ainsi être combinées à la RT afin d'améliorer la reprogrammation radio-induite des TAMs, nous pouvons citer l'ensemble des agents thérapeutiques ciblant la reprogrammation fonctionnelle des TAMs, énumérés dans la **Table 4** (cf. 1.4.2.6.4). De plus, des stratégies thérapeutiques combinatoires entre RT et certains de ces

agents sont déjà étudiées en cliniques et résumées dans la **Table 4**.

Cible d'intérêt	Agent thérapeutique	Combinaison	Indications	Essais cliniques	Références
CD40	CDX-1140	RT + Poly-ICLC – FLT3-L	Cancer du sein	Phase I	NCT046616248
PI3Kγ	BYL719	RT + Cetuximab	Cancer de la tête et du cou à cellules squameuses	Phase I	NCT02282371
		RT + Cisplatine	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	Phase I	NCT02537223
	BKM120	RT + Temozolomide	Glioblastome	Phase I	NCT01473901
		RT + Cisplatine	Multiples	Phase I	NCT02113878
TLR3	Poly-ICLC	RT + Temozolomide	Glioblastome multiforme	Phase II	NCT00262730
TLR7	Imiquimod	RT + Cyclophosphamide	Cancer du sein	Phase I/II	NCT01421017
TLR9	SD-101	RT	Lymphome à cellule B	Phase I/II	NCT06266147
		RT + Ibrutinib	Lymphome folliculaire	Phase I/II	NCT02927964
		RT + Nivolumab	Cancer du pancréas	Phase I	NCT04050085

Table 4 - Combinaison de la RT avec des agents ciblant la reprogrammation des TAMs. PI3K : sous-unité catalytique du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase ; RT : radiothérapie ; TLR : récepteur de type Toll. Adaptée de (440).

Par ailleurs, lors de nos travaux, nous avons également porté une attention particulière aux récepteurs purinergiques, apprécié leur capacité à participer à la reprogrammation pro-inflammatoire des macrophages et envisagé leur combinaison avec la RT.

2.4.2. Cibler les récepteurs purinergiques

2.4.2.1. Généralités

Les récepteurs purinergiques sont présents, chez l'Homme, dans tous les tissus et types de cellules (441). Ils sont activés par plusieurs ligands : des nucléosides, tels que l'adénosine, ou encore par des nucléotides à base purique ou pyrimidique, tels que l'ATP, l'adénosine diphosphate (ADP), l'uridine triphosphate (UTP) et l'uridine diphosphate (UDP), ou UDP-sucres. Une fois activés, les récepteurs purinergiques vont réguler de nombreuses voies de signalisation physiologiques, impliquées dans la prolifération, la différenciation, la migration et

la mort cellulaire. La dérégulation de cette signalisation purinergique peut contribuer à diverses pathologies, telles que le cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires ou neuronales (441).

2.4.2.1.1. La signalisation purinergique

Les nucléosides et les nucléotides participent à des fonctions cellulaires vitales, telles que la synthèse d'ARN ou d'ADN ou encore leur rôle de co-facteurs de réactions enzymatiques, de second messager. Mais ils peuvent également être sécrétés dans l'espace extracellulaire et agir comme des molécules clés de transduction de signal.

Les nucléotides, en particulier l'ATP, constitue une source d'énergie majeure et bien connue pour l'organisme. Au sein des cellules de mammifères, l'ATP est synthétisée par la phosphorylation oxydative et la glycolyse. A l'état stable, l'ATP est stockée de manière intracellulaire à une concentration entre 1 et 10 mM, bien plus importante que sa concentration extracellulaire de l'ordre du nanomolaire (442). Sous certaines conditions, une libération importante d'ATP dans l'espace extracellulaire peut être observée. En cas d'apoptose ou nécrose, l'ATP est libérée de manière passive à travers la membrane des cellules mortes (443). L'ATP peut également être libérée par des cellules vivantes lors d'une lésion ou d'un stress cellulaire, tels que des stimulations mécaniques (444), ou encore lors d'infections par des micro-organismes pathogènes (445). Cette sortie extracellulaire d'ATP peut s'expliquer par plusieurs mécanismes, tels que la diffusion à travers des canaux membranaires, comme la pannexine 1 (Panx1), la connexine 43 (Cx43). Au cours de l'apoptose cellulaire, Panx1 est clivée par les caspases 3 et 7, conduisant à sa forme tronquée et active, qui régule la libération de nucléotides (ATP, UTP, AMP) par les cellules apoptotiques (446). De plus, les cellules endothéliales ou les neutrophiles activés, peuvent également libérer de l'ATP par l'intermédiaire de ces deux canaux (447–449). D'autre part, la libération d'ATP extra-cellulaire peut se faire par exocytose à partir de vésicules riches en ATP, tels que les granules intracellulaires des plaquettes, libérant leur ATP et ADP par exocytose en cas d'activation (450) ; ou encore les lysosomes, constituant une importante source d'ATP extracellulaire par l'exocytose lysosomale en conditions d'autophagie (451).

L'UTP, quant à lui, est présent au niveau cellulaire à environ 10% des niveaux d'ATP (452). La synthèse de l'UTP peut se faire soit *de novo*, soit par récupération de l'uridine. Ces deux voies peuvent contribuer à un pool d'UTP libre, source potentielle d'UTP pour l'activation des récepteurs purinergiques (452). Enfin la sortie d'UTP est régie par les mêmes mécanismes impliqués dans la sortie extracellulaire d'ATP (e.g. sortie par nécrose cellulaire, à la suite d'un stress mécanique ou encore lors de l'exocytose des granules denses plaquettaires) (444,453,454).

Dans l'espace extracellulaire, l'ATP et l'ADP sont rapidement métabolisées en adénosine monophosphate (AMP), à son tour métabolisée en adénosine (455). Des ectoenzymes sont impliquées dans ce processus d'hydrolyse des nucléotides. Premièrement la conversion en AMP est assurée par l'ecto-nucléoside triphosphate disphosphohydrolase 1 (NTPDase 1, également appelée CD39). Deuxièmement, l'ecto-5'-nucléotidase (également appelé CD73) assure la génération d'adénosine à partir d'AMP (455). Il est à noter que l'adénosine peut également être générée, selon une deuxième voie, à partir du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD+) et grâce à l'action coordonnée de CD38 (NAD glycohydrolase), générant de l'ADP-ribose et de l'ectonucléotide pyrophosphatase-phosphodiestérase 1 (PC-1, aussi appelé CD203a), générant de l'AMP. L'élimination du dernier phosphate, se fait par l'intermédiaire de CD73, qui régule ainsi la dernière étape des voies générant l'adénosine (**Figure 23**) (456).

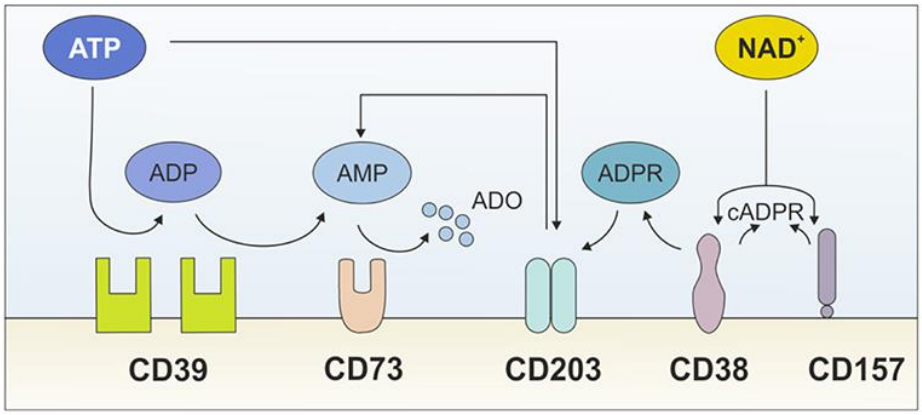


Figure 23 - Réseau des ectonucléotidases.
ADP : adénosine diphosphate ; ADPR : ADP-ribose ; AMP : adénosine monophosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; cADPR : ADPR cyclique ; ADO : adénosine ; NAD+ : nicotinamide adénine dinucléotide (456).

A l'état stable, la concentration d'adénosine extracellulaire est de l'ordre de 10nM, maintenue par la présence de transporteurs de nucléosides équilibrants (ENT) (457). En conditions pathologiques, cette concentration d'adénosine est considérablement augmentée (458). L'adénosine étant issue de l'hydrolyse de l'ATP/ADP, les sources de sa sortie extracellulaire sont les mêmes que celles responsables de la sortie de ces derniers., associées principalement à une augmentation de l'hydrolyse des nucléotides via l'axe CD39/CD73 (458). Les nucléotides et nucléosides, ainsi présents au niveau extracellulaire, agissent comme des molécules de signalisation par l'activation des récepteurs purinergiques.

2.4.2.1.2. Les familles de récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques sont divisés en deux familles selon leur affinité pour leurs ligands : les récepteurs P1, également appelés récepteurs à adénosine du fait de leur affinité pour l'adénosine et les récepteurs P2, activés par les nucléotides (ATP, ADP, UTP, UDP, UDP-

sucres) (459).

Les **récepteurs P1** sont des récepteurs couplés aux protéines G, à sept domaines transmembranaires, dont le ligand endogène est l'adénosine. Il a été décrit 4 récepteurs P1 : les récepteurs A1, A2A, A2B et A3 (459). Ils sont caractérisés par un couplage différent aux protéines G : les récepteurs A1 et A3 sont couplés aux protéines Gi/o et Gq et inhibent ainsi l'adénylate cyclase (AC) et la production d'AMP cyclique (AMPc). Tandis que les deux autres récepteurs A2A et A2B sont couplés aux protéines Gs et induisent une activation de l'AC, entraînant une accumulation d'AMPc. Les récepteurs A2B peuvent également activer la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de la protéine Gq et induire une libération de calcium intracellulaire (460,461). Enfin, ces 4 récepteurs se couplent aux voies de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) : comprenant la kinase régulée par le signal extracellulaire 1 (ERK1), ERK2, la kinase JUN N-terminale (JNK) et la MAPK p38 (461) (**Figure 24**). Ce sont des voies de signalisation clés, régulant de nombreux processus cellulaires, notamment la différenciation, l'apoptose et la réponse au stress.

Les récepteurs P1 sont impliqués dans le contrôle des activités neuronales, cardiaques, métaboliques et rénales, expliquant leur distribution au niveau du système nerveux, cardiovasculaire, respiratoire, gastro-intestinal, urogénital et immunitaire (460).

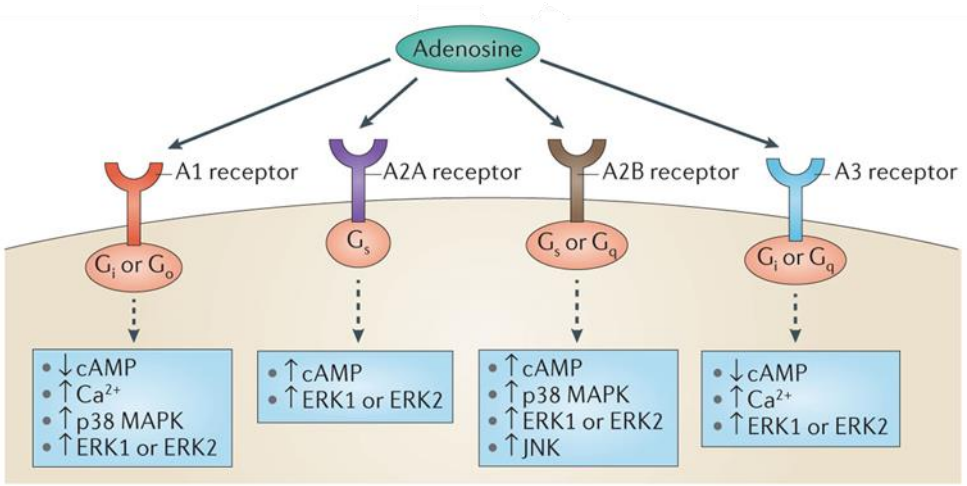


Figure 24 - L'activation des récepteurs à adénosine.
L'adénosine extracellulaire peut activer quatre récepteurs métabotropiques distincts, activant différentes voies de signalisation. Adaptée de (461).

Les **récepteurs P2** peuvent être subdivisés en deux sous-familles : les récepteurs ionotropiques P2X et les récepteurs métabotropes P2Y, présentant différentes affinités pour les nucléotides (**Table 5**).

Agoniste	Récepteurs
ATP	P2X1-P2X7, P2Y2, P2Y11
ADP	P2Y1, P2Y12, P2Y13
UTP	P2Y2, P2Y4
UDP	P2Y6, P2Y14
UDP-sucres	P2Y14

Table 5 – Agonistes endogènes des différents récepteurs purinergiques P2.

Les récepteurs P2X sont des récepteurs à canaux ioniques, composés de 7 sous-types : P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5, P2X6 et P2X7 (459). L'ATP est leur principal agoniste endogène (**Table 5**). Après fixation de l'ATP, ces canaux induisent des flux ioniques transmembranaires : un afflux d'ions sodiques (Na^+) et calciques (Ca^{2+}) et un efflux d'ions potassiques (K^+). Le changement de ces flux ioniques induit une dépolarisation de la membrane, déclenchant l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage. Le calcium intracellulaire ainsi accumulé active de nombreuses voies de signalisation, telles que celles des MAPK ou de la calmoduline (462,463). Cette dernière est essentielle pour les réponses immunitaires et inflammatoires des tissus. L'activation prolongée par l'ATP peut conduire à une dilatation de certains de ces canaux (P2X2, P2X4 et P2X7), permettant le passage de grandes molécules (jusqu'à 900 daltons), y compris l'ATP lui-même (462,463).

Les récepteurs P2X sont présents de manière ubiquitaire dans l'ensemble de l'organisme. Ils jouent un rôle particulièrement important au sein du système nerveux, notamment dans la neurotransmission et la nociception. Leur implication dans les maladies cardiovasculaires ainsi que dans l'inflammation et l'immunité a également été décrite (463).

Les récepteurs P2Y sont des récepteurs couplés aux protéines G, composés de 8 sous-types : P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 et P2Y14 (459). Chacun présente une affinité différente pour les différents nucléotides (**Table 5**). Parmi cette sous-famille, deux sous-groupes ont été définis, selon leur homologie de séquence. Un premier groupe comporte les récepteurs P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 et P2Y11, couplés par l'intermédiaire de la protéine Gq, à la PLC, dont la stimulation est suivie d'une augmentation des phosphates inositols (IP3), menant à la libération de calcium intracellulaire. Le récepteur P2Y11 est quant à lui, additionnellement couplé à la protéine Gs, entraînant une augmentation de l'AMPc (464,465). Un deuxième groupe avec les récepteurs P2Y12, P2Y13 et P2Y14, couplés à la protéine Gi/o, inhibent l'activité de l'AC et la production d'AMPc (464,465).

Les récepteurs P2Y sont exprimés au niveau de l'ensemble des cellules de l'organisme. Ils sont impliqués dans la régulation du système nerveux, cardiovasculaire, métabolique et immunitaire. Ils jouent également un rôle dans la régulation de l'inflammation (466).

La **Figure 25** résume l'activation des différents types de récepteurs purinergiques évoquée. Il est à noter, que les récepteurs purinergiques peuvent être présents à la surface de la cellule

même libérant l'ATP (signalisation autocrine) ou des cellules voisines (signalisation paracrine) ou les deux (467).

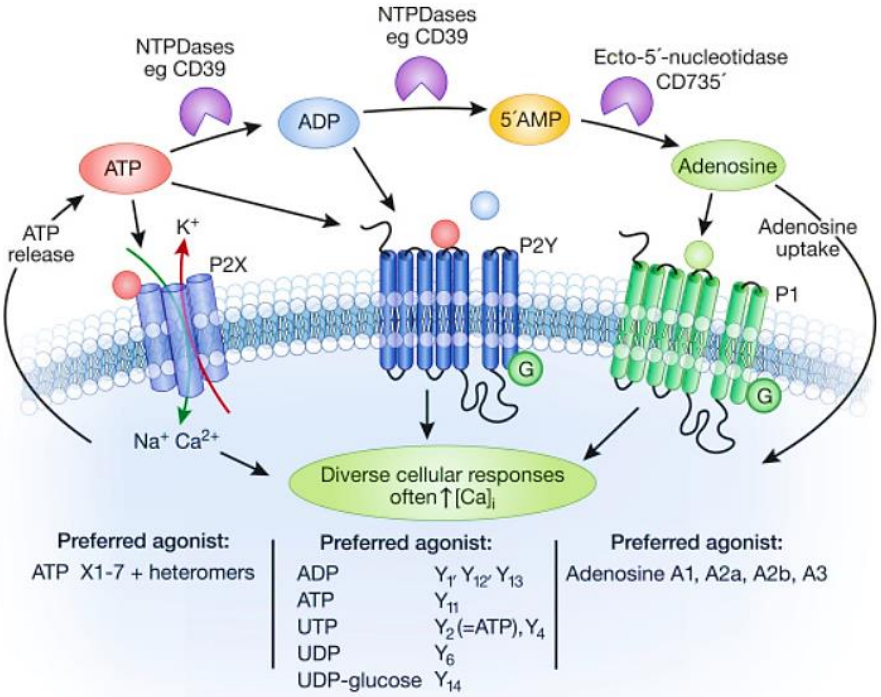


Figure 25 - Activation du système purinergique (468).

2.4.2.1.3. Expression des récepteurs purinergiques au niveau des macrophages

Au niveau des macrophages, l'expression de plusieurs récepteurs purinergiques est retrouvée. Des analyses d'expression ont été réalisées pour tous les récepteurs purinergiques : l'ARNm et les protéines ainsi obtenues et les tests fonctionnels réalisés ont démontré que P2X4, P2X7, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12 et les quatre récepteurs P1 sont exprimés dans les macrophages (469,470). Les preuves d'expression des autres récepteurs purinergiques sont relativement faibles (471) et des travaux supplémentaires sont nécessaires pour confirmer s'ils sont bien exprimés dans les macrophages.

Comme exposé auparavant, les macrophages présentent une forte hétérogénéité dépendante de leur micro-environnement (54). Ainsi les différents macrophages de l'ensemble de l'organisme peuvent exprimer différents récepteurs purinergiques. Le récepteur P2Y12, par exemple, est fortement exprimé au niveau de la microglie, mais il n'est pas retrouvé au niveau des autres macrophages résidents (472).

Pour conclure sur cette partie, les récepteurs purinergiques constituent une large famille de récepteurs, activés par nucléotides et nucléosides, largement retrouvés (à l'état stable et pathologique) au niveau cellulaire. Leur activation conduit à la modulation de nombreuses voies de signalisation, notamment les voies calciques, impliquées dans un large éventail de fonctions cellulaires. De plus, ces récepteurs sont largement exprimés au niveau des macrophages.

2.4.2.2. Modulation des activités biologiques des macrophages par les récepteurs purinergiques

Les récepteurs purinergiques étant exprimés au niveau des macrophages et leur activation étant associée à de nombreuses voies de signalisation impactant les fonctions cellulaires, ils peuvent être impliqués dans les activités biologiques des macrophages.

2.4.2.2.1. La migration

La présence de nucléotides dans l'espace extracellulaire joue un rôle dans le chimiotactisme des macrophages, impliquant ainsi la signalisation purinergique dans cette activité biologique. Comme nous l'avons précédemment mentionné, les cellules apoptotiques libèrent de l'ATP, de l'AMP et de l'UTP, qui peut constituer alors un signal chimiotactique afin de recruter des monocytes et macrophages, afin que ces derniers puissent éliminer les cellules mortes (473). Il a été montré qu'un traitement par apyrase, molécule dégradant les nucléotides, ou par expression ectopique de CD39, altère le recrutement des phagocytes au niveau des corps apoptotiques (474). Cette même étude a par la suite démontré que les surnageants de cellules apoptotiques étaient capables de recruter des monocytes et macrophages et que ce recrutement était diminué chez les souris dépourvues du récepteur purinergique P2Y2 (474). Ces résultats démontrent ainsi que les nucléotides libérés par les cellules apoptotiques servent de signal chimioattractant pour le recrutement P2Y2-dépendant des monocytes et macrophages. Dans un contexte tumoral, il a été montré le rôle de P2Y12 pour induire la migration des macrophages vers les zones tumorales nécrotiques riches en nucléotides (475). Au niveau du système nerveux central, la libération d'ATP est observée lors de dommages cellulaires et permet la migration des cellules microgliales vers les sites d'endommagement (476). Par la suite, deux études ont démontré l'implication des récepteurs purinergiques P2Y12 et P2X4 dans le chimiotactisme microglial induit par l'ATP (477,478).

Les nucléotides peuvent également influencer la migration des macrophages d'une manière indirecte. En effet, il a été montré que dans certains cas les macrophages migrent vers leur chimioattractant cible, grâce à la libération autocrine d'ATP, qui va amplifier cette migration. C'est le cas notamment, pour les chimioattractants, tels que la protéine C5a du complément ou encore par le N-formyl-méthionylleucyl-phénylalanine (fMLP) sécrété par certains pathogènes. On parle de boucle de rétroaction purinergique autocrine, impliquant les récepteurs purinergiques P2Y2, P2Y12 et les récepteurs de l'adénosine A2a, A2b et A3. L'activation de ces récepteurs purinergiques permet la formation de lamellipodes, nécessaire à la migration des macrophages (479) (**Figure 26**).

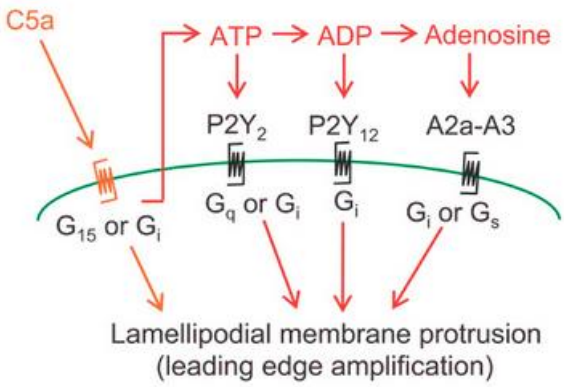


Figure 26 - Modèle proposé de signalisation purinergique autocrine.
Exemple de la chimiotaxie des macrophages vers le chimioattractant C5a (479).

L'ATP peut donc d'une part lui-même représenté un signal chimiotactique, libéré par les cellules mourantes et d'autre part sa signalisation autocrine peut amplifier la migration des macrophages vers des signaux cibles. Cependant ce premier point a été challengé par l'équipe de Peter J. Hanley. Ces derniers ont démontré, par de l'imagerie en temps réel que la surexpression des récepteurs P2Y2 et P2Y12 en présence de leurs agonistes ne suffisait pas à induire une migration plus importante, suggérant que l'ATP ne constitue pas un signal chimiotactique (480). Les résultats précédemment exposés démontrant l'inverse, pourraient ainsi s'expliquer par une interférence avec la signalisation autocrine de l'ATP. De plus, les nucléotides ont une courte demi-vie dans l'espace extracellulaire, ce qui en fait des signaux inadaptés à longue portée. Dans ce sens, il peut être proposé que les nucléotides s'échappant des cellules mourantes pourraient agir comme un signal local, à courte portée, influençant la formation de lamellipodes des macrophages locaux.

2.4.2.2.2. La phagocytose

Les nucléotides, représentant un signal « find-me » à portée locale, il est ainsi déterminant de se demander si au-delà d'attirer les macrophages, ils peuvent également représenter un signal « eat-me », pouvant induire l'activité phagocytaire des macrophages. Dans ce sens, Marques-da-Silva et *al.* ont montré que le traitement de macrophages péritonéaux avec différents nucléotides (ATP, ADP, UTP, UDP) pendant 30 minutes est suffisant pour augmenter la phagocytose des cellules apoptotiques par ces cellules immunitaires, notamment par l'augmentation d'expression des récepteurs phagocytaires (481). Par ailleurs, Zumerle et *al.* ont démontré que cette activation de la phagocytose par l'ATP, est dépendante d'une signalisation calcique intercellulaire (482). Par la suite, il a été démontré l'implication des récepteurs purinergiques P2X dans cette modulation de la phagocytose, à la suite des traitements avec des nucléotides extracellulaires (au moins P2X1, P2X3, P2X4 et P2X7) (481,482). Cependant, d'autres travaux ont également démontré que le traitement par des agonistes de P2X7 réduit la phagocytose des billes de latex dans la microglie (483) et des billes de latex et des bactéries dans les macrophages (484). Marques-da-Silva et *al.* corroborent en partie ces derniers

résultats. Selon leurs travaux, l'exposition longue aux agonistes de P2X7 réduit la phagocytose des billes de latex dans les macrophages, tandis qu'une exposition brève (10 minutes) augmente cette activité phagocytaire (481). Cela suggère que l'effet du récepteur P2X7 sur l'activité phagocytaire pourrait dépendre de la concentration en nucléotides et du temps d'exposition. D'autres travaux ont montré l'impact des nucléotides uridiques (UDP et UDP-sucre) sur l'activité du récepteur P2Y6 à médier l'activité phagocytaire microgliale. Lors de lésions neuronales induites *in vitro* et *in vivo* par traitement avec acide kaïnique, il a été observé une régulation positive de l'expression des récepteurs P2Y6, colocalisée avec les cellules microgliales activées et conduisant à l'élimination des neurones endommagés (485). De plus, il a également été montré que le blocage de cette signalisation UDP/P2Y6 permet de prévenir la perte neuronale, causée par divers stimuli activant la phagocytose microgliale de ces neurones (486). De manière intéressante, les lésions neuronales induisent également une sortie extracellulaire d'ATP ou d'ADP, qui n'a pas d'effet sur l'activité de P2Y6 ; tout comme l'UTP n'a pas d'effet sur P2Y12, impliqué dans la chimiotaxie microgliale. Ainsi, la libération simultanée de ces nucléotides d'adénine et d'uridine pourrait réguler à la fois la chimiotaxie et la phagocytose, de manière exclusive et coordonnée.

Concernant l'impact des récepteurs à adénosine sur la phagocytose, très peu d'études s'y sont intéressées. Le peu d'études disponibles semblent montrer que l'adénosine via l'activation des récepteurs A2 exerce un effet inhibiteur sur l'activité phagocytaire, mais cela reste à être démontré de manière plus robuste (487,488).

2.4.2.2.3. La présentation de l'antigène

L'implication du récepteur purinergique P2X7 sur la fonction des macrophages à présenter l'antigène a été étudié. Ces travaux ont montré que l'activation de P2X7 par l'ATP dépendant ou non du lipopolysaccharide (LPS), diminue la quantité de CMH de classe I à la membrane plasmique des macrophages et inhibe ainsi l'activation des cellules T $CD8^+$ (489,490). De plus, d'autres travaux ont mis en avant la capacité de P2X7 à induire également la perte des molécules de CMH de classe II lors d'une infection par *Leishmania amazonensis* (491). D'autres études ont montré que cette perte membranaire de CMH II correspond à la libération de vésicules contenant ces molécules CMH de classe II après traitement par ATP (492) ou après infection par le pathogène *Mycobacterium tuberculosis* (493). Cette libération de vésicules de CMH de classe II semble dépendre de l'activation P2X7-dépendant de l'inflammasome NLRP3 (492). Son rôle sur une potentialisation possible des réponses immunitaires adaptatives reste à étudier. Enfin, il a également été montré que la stimulation des récepteurs A2B par l'adénosine, inhibe l'expression des gènes du CMH II induite par l'interféron-γ (IFN-γ). Or, c'est l'IFN-γ lui-même qui régule positivement l'expression de ces récepteurs A2B. Par conséquent, cette régulation des récepteurs de l'adénosine par l'IFN-γ pourrait représenter un mécanisme de rétrocontrôle afin de réguler l'activation des macrophages (494).

2.4.2.2.4. La cytotoxicité

L'activation des récepteurs purinergiques par les nucléotides libérés au niveau des sites d'inflammation, de lésions ou de lyse cellulaires, a été montrée comme induisant la libération de multiples médiateurs inflammatoires, dont les ROS et RNS (495). En particulier, la libération des RNS a été associée à une augmentation d'expression d'iNOS dépendante de l'ATP libéré par un traitement au LPS de macrophages murins (496).

Parmi les récepteurs P2X, le récepteur P2X7 a particulièrement été décrit comme modulant la production de ROS et de RNS. Plusieurs travaux ont en effet montré que l'activation de P2X7 par l'ATP induit l'activation de la NADPH oxydase au niveau microglial (497), des macrophages murins (498,499), ou encore des macrophages infectés par *Toxoplasma gondii* (500). Dans ce dernier cas, la production de ROS ainsi générée permet de contrôler la charge parasitaire (501). L'activation de P2X7 est également associée à des dommages mitochondriaux, menant à la libération de mtROS (502). D'autres travaux impliquent également le rôle de P2X7 dans l'induction de l'activité d'iNOS, et donc la production de NO, à la suite de la libération d'ATP dépendante du LPS (503–505). Enfin, dans des modèles de sepsis, il a été montré le rôle du récepteur P2X4 dans la production de ROS et de NO, contribuant à la destruction des bactéries (506). Les récepteurs P2Y peuvent également être impliqués dans la génération de ROS et de RNS par les phagocytes. Le traitement par UTP des macrophages infectés par *Leishmania amazonensis*, induit leur production, associée à une augmentation de l'expression des récepteurs P2Y2 et P2Y4 (507). *In vivo*, le même effet a été démontré : le traitement par UTP favorise la production de ROS et le recrutement de cellules phagocytaires, permettant de limiter la réplication du parasite (508). Concernant les récepteurs P1, il a été montré que l'activation des récepteurs A2B inhibe l'expression d'iNOS induite par l'IFN-γ et altère l'activité microbicide des macrophages (494).

2.4.2.2.5. La production de cytokines/chimiokines

La modulation de la sécrétion de cytokines des macrophages par la signalisation purinergique a été très étudiée, notamment au travers de la relation entre le récepteur P2X7 et l'inflammasome NLRP3, que nous allons principalement détailler.

Différents travaux ont constaté que l'ATP stimule la sécrétion d'IL-1β dans les macrophages (509–511). Perregaux et Gabel ont démontré que cette libération d'IL-1β en réponse à l'ATP était dépendante d'une diminution des ions potassiques intracellulaires (512). Dans ce sens, l'activation ATP-dépendante du récepteur purinergique P2X7 conduisant à un fort efflux K^+ et l'inflammasome NLRP3 étant majoritairement à l'origine de la sécrétion d'IL-1β dans les macrophages, le rôle de P2X7 dans la médiation de la sécrétion IL-1β dépendante de NLRP3 a ainsi été questionné. La sécrétion d'IL-1β, ainsi que celle de l'IL-18 par les macrophages, fait suite à la liaison de stimuli inflammatoires (PAMPs, DAMPs, facteurs environnementaux) au niveau des TLRs, qui conduit à l'activation Myd88-dépendant de la voie NF-κB. Cette étape est nécessaire pour l'expression de NLRP3, ainsi que celle de la pro-IL-1β : c'est l'étape de priming.

Par la suite, un signal d'activation permet l'assemblage de l'inflammasome, complexe multiprotéique comprenant la protéine NLRP3, la protéine adaptatrice ASC et la pro-caspase-1. Cette activation permet l'auto-clivage de la caspase-1, qui peut cliver les formes inactives pro-IL-1β et pro-IL-18 en cytokines matures IL-1β et IL-18 (513). L'efflux potassique est connu pour constituer ce second signal d'activation de l'inflammasome NLRP3 (514). Ainsi, il a été montré que l'activation de P2X7 par l'ATP, générant une sortie des ions potassiques, est capable d'activer NLRP3 et de moduler la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18 (515–517) (**Figure 27**). Outre l'efflux de K+, il a été montré que la production de ROS dépendante de l'axe ATP-P2X7 est également capable d'activer la caspase-1 et ainsi la sécrétion d'IL-1β et IL-18, par l'activation de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) (495). Enfin, l'activation de la caspase-1 induit également le clivage de la gasdermine-D, l'amenant à former un pore membranaire, par lequel les cytokines IL-1β et IL-18 formées peuvent être sécrétées. La formation de ce pore est impliquée dans l'induction d'une mort immunogène, appelée pyroptose. L'activation prolongée de P2X7 par l'ATP peut induire cette mort cellulaire *in vitro*, de manière indépendante de la sécrétion des cytokines (518).

De manière assez intéressante, la signalisation purinergique peut aussi représenter un moyen pour le macrophage de contrer l'inflammation induite, afin de limiter les dommages tissulaires. Dans ce sens, la signalisation passant par l'adénosine semble réguler négativement les cytokines inflammatoires médiées par les macrophages, notamment en cas d'inflammation excessive via l'activation du récepteur A2A (519). Il a été montré que la région promotrice des récepteurs A2A contient des sites de liaison pour NF-κB, STAT1 et le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes-γ (PPARγ), démontrant que l'expression de ces récepteurs est augmentée en conditions inflammatoires (520,521). Lors de la phagocytose, plus l'inflammation s'installe et plus l'expression des récepteurs A2A devient majoritaire et inhibe la sécrétion de chimiokines CXCL1 et CXCL2, recrutant les neutrophiles (522) (**Figure 27**).

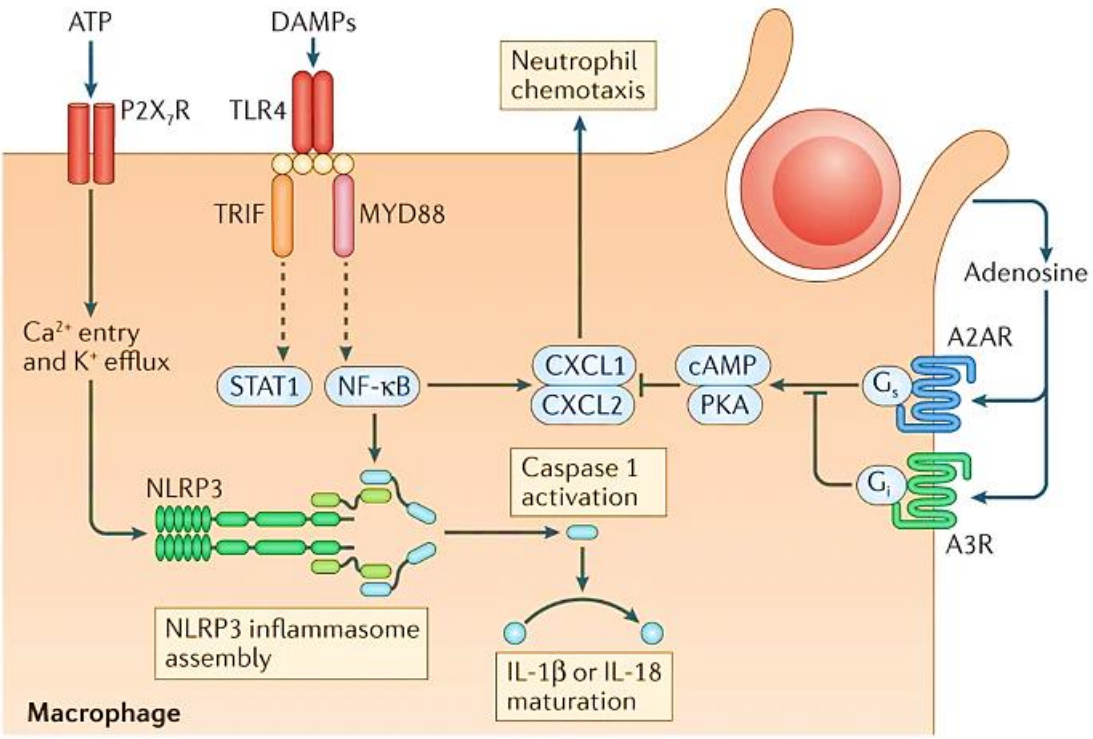


Figure 27 - Exemples de l'influence de la signalisation purinergique sur la sécrétion de cytokines des macrophages.
A la suite du priming par la voie NF-κB initié par la signalisation TLR4-Myd88, l'activation du récepteur P2X7 par l'ATP permet l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la maturation des cytokines IL-1β et IL-18, dépendante de la caspase-1. En conditions de phagocytose, les macrophages recrutent les neutrophiles par la sécrétion des chimiokines CXCL1 et CXCL2. L'adénosine, via les récepteurs A2A et A3 peut respectivement soit inhiber ou stimuler ces sécrétions (469).

2.4.2.3. Modulation de l'activation des macrophages par les récepteurs purinergiques

Selon l'état d'activation des macrophages, un profil différent de récepteurs purinergiques a été observé : notamment entre une polarisation induite par l'IL-4 en opposition à celle induite par un signal LPS + IFN-γ. Il a ainsi été suggéré que les macrophages adaptent leur répertoire de récepteurs purinergiques selon les stimuli d'activation reçus (523).

Plusieurs études ont souligné le rôle important de l'adénosine et ses récepteurs, dans ce contexte. Une première étude a démontré que le traitement par adénosine de macrophages activés par IL-4 et IL-13, conduit à une augmentation d'expression de l'arginase-1, signe d'une activité anti-inflammatoire, dépendante des récepteurs A2A et A2B et médiée par le facteur de transcription C/EBPβ (524) (**Figure 28**). De même, une autre étude a permis de mettre en avant, l'implication de l'adénosine et du récepteur A2A, dans la régulation positive de l'arginase-1, induite par l'activation des macrophages murins RAW264.7 et BMDMs par l'IL-10 et médiée

par l'activation de STAT3 (525). L'adénosine régule ainsi des voies d'activation des macrophages différentes selon le stimulus anti-inflammatoire perçu. De manière intéressante, une expression accrue des récepteurs purinergiques A2A est observée lors de l'activation des macrophages par le LPS + IFN-γ (523). En effet, il a été montré que l'ATP libérée, après stimulation des TLRs, est très vite hydrolysée par les ectonucléotidases CD39 et CD73 et permet la génération d'adénosine, activant les récepteurs principalement exprimés, A2A et A2B. Il s'en suit alors l'induction de voies de signalisation inhibant la synthèse de facteurs pro-inflammatoires tout en activant celle de facteurs régulateurs de l'inflammation afin d'éviter une activation trop importante des macrophages (526). Il a été montré que la signalisation de l'adénosine par les récepteurs A2A et A2B régule négativement NF-κB, soit par l'activation des récepteurs nucléaires de la sous-famille 4 groupe A (NR4A) (527) (**Figure 28**) ou soit par interaction directe inhibitrice avec la sous-unité p105 de NF-κB (528). Enfin, l'adénosine est également connue pour induire le macrophage à adopter des fonctions angiogéniques, notamment par l'induction de la sécrétion de VEGF (529) (**Figure 28**).

Concernant les nucléotides, leur rôle dans la modulation de l'activation des macrophages est aussi décrit. Tout d'abord au niveau microglial, une étude a montré qu'en réponse à l'ADP, la microglie adopte un état d'activation, caractérisé par une augmentation rapide de leur concentration intracellulaire en calcium, une libération de cytokines pro-inflammatoires et une capacité migratoire importante. L'inhibition spécifique de P2Y12 inverse l'ensemble de ces fonctions citées, soulignant ainsi un rôle du récepteur P2Y12 dans l'activation microgliale (530). Le récepteur P2X4 a aussi été décrit comme modulant négativement la polarisation pro-inflammatoire microgliale, dans un contexte d'encéphalomyélite (531).

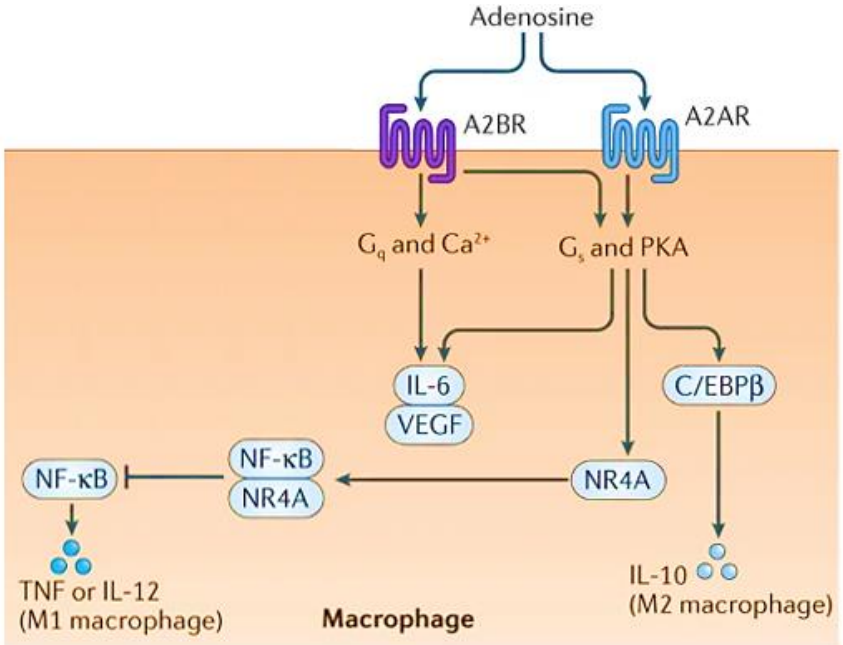


Figure 28 - Exemples de l'influence de la signalisation purinergique sur la polarisation des macrophages. Adaptée de (469).

D'autres études se sont intéressées au récepteur P2Y11 : d'une part, une première équipe a montré que la stimulation des macrophages par le LPS conduit à l'activation de P2Y11, dépendante d'une régulation autocrine via la libération d'ATP par exocytose. Ils ont démontré que l'inhibition de P2Y11 est suffisante pour bloquer l'activation des macrophages pas le LPS *in vitro* et *in vivo* (532). Plusieurs équipes ont par la suite montré que l'expression de P2Y11 peut aussi être augmentée dans l'activation anti-inflammatoire des macrophages, induite par le M-CSF (533) ou l'IL-10 (534). Cette augmentation induit des propriétés anti-inflammatoires et angiogéniques, qui sont médiées par SOCS3 au niveau des macrophages activés par M-CSF (535). De manière intéressante, Klaver et *al*. ont mis en avant que l'activation M-CSF dépendante de P2Y11 régule négativement les signaux d'amorçage et les signaux secondaires (ATP-P2X7 dépendant) de l'inflammasome NLRP3, de même que l'expression des composants de cet inflammasome (NLRP3, caspase-1, ASC) (535).

Enfin, à la fin des années 90, plusieurs travaux ont décrit le rôle de P2Y2 dans la différenciation des monocytes en macrophages (536–538). Peu d'études se sont ensuite intéressées à caractériser les fonctions de ces macrophages ainsi activés. Récemment, des travaux préliminaires de S. Thevananther et de ses collaborateurs, démontrent l'implication de la signalisation purinergique P2Y2 dans l'activation pro-inflammatoire des macrophages, médiée par TLR4 (539,540). Nous reviendrons sur ces travaux, notamment en les comparant avec nos propres travaux dans la partie discussion.

Concernant, la dynamique des mitochondries, celle-ci permet la régulation des niveaux d'ATP intracellulaire. La fusion mitochondriale permet l'élongation des mitochondries et une production accrue d'ATP. La fission, en revanche, est un processus qui consomme de l'ATP. Ainsi, fusion et fission peuvent toutes deux influencer de manière antagoniste la production d'ATP (541). Enfin, peu d'études faisant le lien entre la signalisation purinergique et la dynamique des mitochondries au niveau des macrophages sont décrites dans la littérature. Seule la récente étude de Tao et ses collaborateurs a montré que la libération de calcium, à la suite de l'activation de P2X7 par l'ATP au niveau microgliale, active la calcineurine, à l'origine de la déphosphorylation de DRP1 S637. Fonctionnellement, cela se traduit par une augmentation de la fission mitochondriale, qui peut être associée à une diminution de la phagocytose (542).

Pour conclure, la signalisation purinergique intervient dans la régulation de chacune des fonctions des macrophages ainsi que dans leur polarisation. Le ciblage des récepteurs purinergiques en particulier constitue ainsi une cible thérapeutique afin de moduler les activités des macrophages.

2.4.2.4. Implications des récepteurs purinergiques dans le TME

La signalisation purinergique module les activités biologiques des macrophages et son

altération peut être associée dans des contextes pathologiques. Le ciblage de cette signalisation peut ainsi représenter une cible thérapeutique pour plusieurs maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, neuronales et le cancer (441). Dans la partie suivante nous allons détailler l'implication de cette voie purinergique dans un contexte tumoral.

2.4.2.4.1. La signalisation purinergique dans le TME

Le microenvironnement (TME) influence les tissus hôtes avoisinants, afin d'instaurer un environnement inflammatoire favorisant la croissance tumorale et inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale. Pour cela, il ne détourne pas uniquement les cellules immunitaires recrutées, mais sécrète également des facteurs solubles soutenant la croissance tumorale. La signalisation purinergique avec l'adénosine et les nucléotides (principalement l'ATP) est ainsi présente dans le TME (543).

L'ATP est présent au niveau du milieu extracellulaire des tumeurs solides, à une concentration entre 100 à 500µM, alors qu'au sein des tissus sains cette concentration extracellulaire d'ATP est de l'ordre du nanomolaire (544). Les thérapies anti-cancéreuses et notamment la radiothérapie en autres induit la mort des cellules tumorales, détériorant la membrane plasmique et conduisant à une libération accrue d'ATP extracellulaire dans le TME. Outre cette libération passive, les cellules sont aussi capables de libérer de l'ATP de manière active dans le TME, par exocytose de vésicules d'ATP (e.g. lors de l'activation des cellules T (545)), ou encore par les transporteurs ou les canaux membranaires (e.g. Cx43, Panx1 et P2X7 lui-même) (543). L'accumulation d'ATP dans le TME peut provenir soit d'une libération lytique ou soit d'une libération non lytique, et tous les types cellulaires du TME peuvent libérer de l'ATP (546). L'ATP extracellulaire peut être hydrolysé afin de générer de l'adénosine, notamment par l'action séquentielle des ectonucléotidases CD39 et CD73, constituant la principale source d'adénosine extracellulaire dans le TME. Ces enzymes sont exprimées par toutes les cellules de l'interface tumeur-hôte. Outre CD39 et CD73, la voie non canonique dépendante de CD38 est aussi impliquée dans la production d'adénosine extracellulaire dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides. Cette voie semble importante notamment dans des conditions associées à une baisse d'activité de CD39, telles que le stress oxydatif (547). La concentration d'adénosine est 30% plus élevée dans le TME que dans les tissus sains (544).

Il est intéressant de noter que selon le type de cancer, différents niveaux de concentration d'ATP et d'adénosine peuvent être retrouvés, notamment expliqués par une expression différentielle des enzymes CD39 et CD73 (548). De même dans les zones hypoxiques du TME, il a été montré que le facteur HIF-1 est capable d'induire l'expression de CD39 et CD73 et ainsi favoriser la production d'adénosine dans cette zone (549,550). Le TGF-β est aussi un inducteur d'expression de CD39 et CD73 au niveau tumoral (547). Par ailleurs, des différences au niveau de l'expression des récepteurs purinergiques sont aussi retrouvées selon le contexte tissulaire

(551), par exemple dans ces mêmes zones hypoxiques une expression accrue des récepteurs à adénosine A2 est observée (552,553). L'ensemble de ces différences influence fortement les réponses cellulaires induites par la signalisation purinergique.

2.4.2.4.2. Les effets de la signalisation purinergique sur le TME

La signalisation purinergique joue un rôle complexe au sein du TME et peut agir sur le métabolisme et la croissance des cellules tumorales, tout comme affecter la migration et l'activation des cellules immunitaires (543).

Concernant les cellules tumorales, la signalisation purinergique peut agir sur (i) la prolifération cellulaire, (ii) la migration et l'induction métastatique, ainsi que sur (iii) le métabolisme de ces cellules. Selon le type de cancer et la quantité d'ATP présente, les purines peuvent avoir des effets opposés sur la croissance tumorale (543). Par exemple, au niveau de la croissance tumorale, il a été montré que l'activation des récepteurs P2Y1, P2Y2, P2Y6 et P2X7 induit une prolifération des cellules tumorales par l'activation de plusieurs voies trophiques intracellulaires (PI3K-AKT, ERK-MAPK) (554). De manière contradictoire, il a également été montré qu'une importante concentration d'ATP dans le TME induit aussi la mort des cellules cancéreuses. Cet effet passe notamment par le récepteur P2X7 et sa capacité à former des macropores (555), mais les récepteurs P2Y1 et P2Y2 ont également été impliqués (543).

Concernant les cellules immunitaires, la signalisation purinergique peut aller de l'immunostimulation à l'immunosuppression. Des niveaux faibles d'ATP favorisent l'immunosuppression (556). L'ATP extracellulaire étant la principale source d'adénosine dans le TME, les faibles niveaux d'ATP favorisent indirectement l'immunosuppression en provoquant l'accumulation d'adénosine. Plusieurs études se basant sur divers modèles murins, ont ainsi montré que l'adénosine via l'activation de ses récepteurs A2A et A2B inhibe l'activité anti-tumorale des cellules T $CD8^+$ et des cellules NK (557–559). Il a été démontré que la signalisation du récepteur A2A au niveau lymphocytaire, inhibe la production d'IFN-γ, de TNF, de perforine et des granzymes (547). De plus, la signalisation A2A a également été décrite comme impactant la maturation des cellules NK et induisant l'expression de plusieurs récepteurs co-inhibiteurs des lymphocytes T à leur surface (LAG3, TIM23 et PD-1) (558,560). En outre, la signalisation A2B activée par l'adénosine et les faibles niveaux d'ATP orientent la différenciation des DC vers une production de facteurs anti-inflammatoires et tolérogènes (IL-4, IL-5 et IL-10), associés à une capacité limitée de présentation de l'antigène (561). Enfin, la signalisation A2A et A2B ainsi que le caractère chimioattractant de l'ATP favorisent le recrutement et la prolifération des cellules Treg (562,563). Ces Treg sont également recrutées à la suite de la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β par les cellules myéloïdes suppressives, recrutées par l'adénosine. L'ensemble de ces mécanismes démontre l'immunosuppression induite par la signalisation purinergique au sein du TME. A l'opposé, les niveaux élevés d'ATP favorisent l'immunité anti-tumorale (556), par le recrutement et l'activation des DC et la présentation de l'antigène tumoral, associée à une

capacité d'initier une réponse immunitaire de type Th1. Ces niveaux d'ATP sont également suffisants pour activer les récepteurs P2X7, induisant une libération importante d'IL-1β dépendante de l'inflammasome NLRP3 des cellules myéloïdes, soutenant la réponse immunitaire Th1 (**Figure 29**) (564).

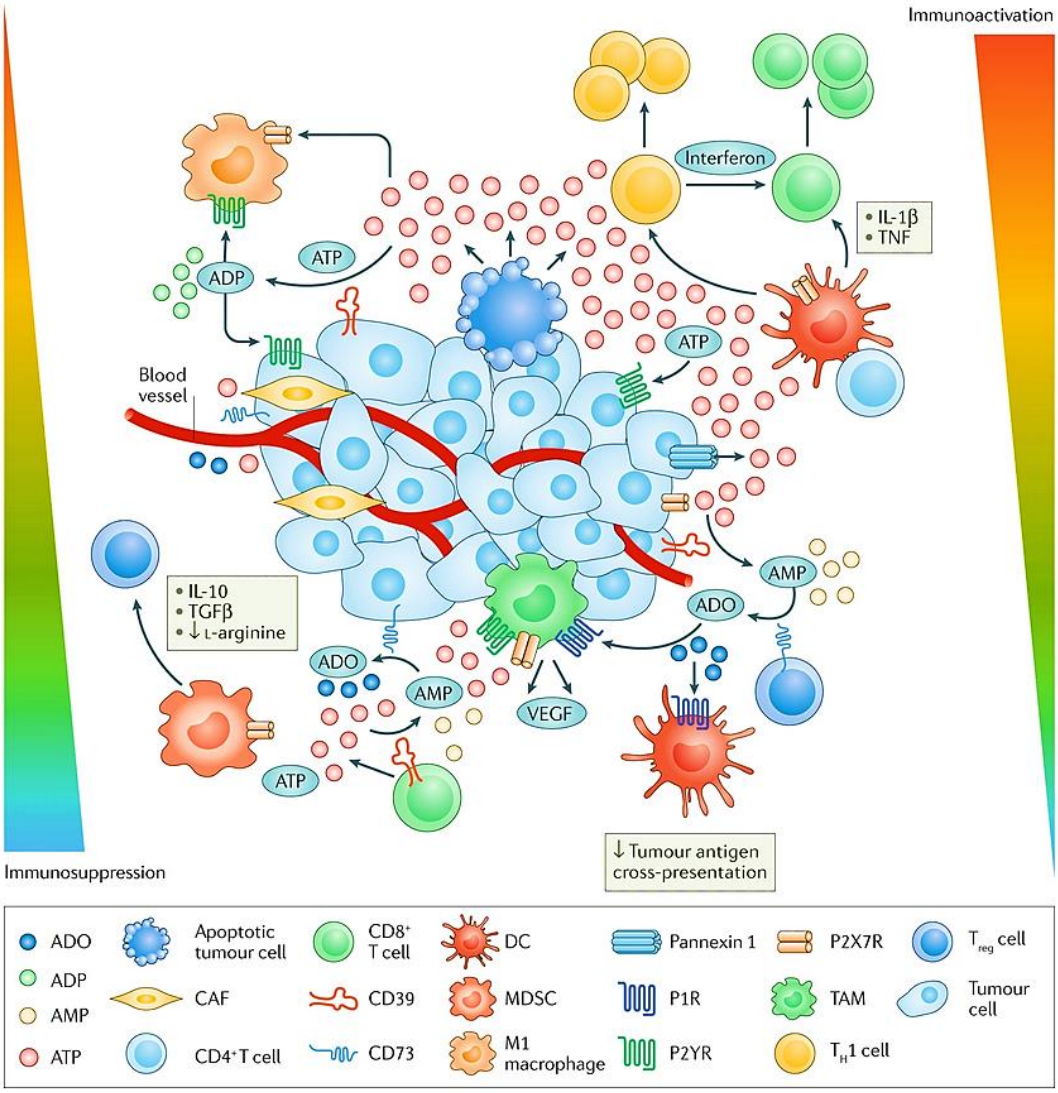


Figure 29 - Modulation des réponses immunitaires par la signalisation purinergique au niveau du TME.

Dans le TME, l'ATP extracellulaire libéré peut exercer deux rôles contradictoires, soit un rôle de soutien de l'immunité anti-tumorale (côte droit) ou soit un rôle favorisant l'immunosuppression (côté gauche). De fortes concentrations d'ATP induisent un recrutement important de cellules dendritiques (DC), induisant une réponse anti-tumorale médiée par l'activation des cellules T. Au contraire, des concentrations faibles d'adénosine triphosphate (ATP), associées à des niveaux importants d'adénosine (ADO) induisent un environnement immunosuppresseur, notamment par l'inhibition des cellules immunitaires effectrices, le recrutement des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et cellules T régulatrices (Treg) et la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGF-β) (543).

Enfin, concernant spécifiquement les TAMs, il a été décrit que la plupart des macrophages pro-tumoraux présentent une expression élevée des ecto-nucléotidases CD39 et CD73 ainsi qu'un taux d'hydrolyse d'ATP important, en comparaison aux macrophages anti-tumoraux. Ces différences d'expression influent ainsi sur les niveaux d'adénosine et d'ATP induits après les traitements anti-cancéreux (565).

Une concentration importante d'ATP agit comme un signal de danger et active le récepteur P2X7, conduisant à l'activation de l'inflammasome NLRP3, et la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 au niveau des macrophages. D'autres cytokines et chimiokines sont sécrétées en présence de forte concentration d'ATP, telles que l'IL-6, IL-1α, CCL-2 et TNF-α (566). L'ensemble participe aux fonctions anti-tumorales des macrophages.

Au contraire, il a été décrit que de faibles niveaux d'ATP au sein du TME, activent le chimiotactisme des macrophages vers la tumeur, de manière dépendante du récepteur P2Y2 (567). Les macrophages recrutés au niveau de la tumeur sont ainsi différenciés en macrophages pro-tumoraux par la présence d'adénosine. Les effets de l'adénosine sur les macrophages sont principalement médiés par le récepteur A2A, présents à leurs surface (568). L'activation de ce récepteur déclenche plusieurs voies de signalisation modulant l'activation des macrophages et aboutissant à un phénotype pro-tumoral (**Figure 30**). Il a notamment été montré que l'adénosine via son récepteur A2A induit une augmentation des taux d'AMPc, qui permet d'activer le facteur de transcription C/EBP-β, induisant la sécrétion d'IL-10 et l'inhibition de l'expression de gènes pro-inflammatoires dépendante de la protéine SOCS3 (568). Par la suite, il a été révélé que l'induction de la protéine kinase A (PKA) par l'AMPc permet, d'une part, d'inhiber le recrutement de neutrophiles médié par CXCL2 et d'autre part d'inactiver la voie NF-κB et le recrutement de neutrophiles comme décrit précédemment par activation des récepteurs NR4A inhibant directement NF-κB ou encore par la phosphorylation inhibitrice de l'IkB (547). L'ensemble permet d'inhiber l'expression de gènes pro-inflammatoires et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF). L'activation des récepteurs A2A et A2B sur les TAMs au sein du TME, induisent aussi la sécrétion de VEGF permettant l'acquisition de propriétés angiogéniques aux TAMs (569). Enfin, l'adénosine via le récepteur A2B inhibe la présentation de l'antigène sur les TAMs, par inhibition des CMH II (569). De plus, il a été montré que l'activation des récepteurs A2A au niveau des TAMs, induisant l'ensemble des mécanismes décrits, inhibe l'immunité anti-tumorale dans plusieurs modèles murins (570). Cette réponse pro-tumorale passe notamment par l'inactivation de la réponse effectrice anti-tumorale des cellules T $CD8^+$ et des NK (570).

Enfin, les récepteurs P2 (P2Y2, P2Y11, P2Y12) peuvent aussi être impliqués dans la régulation de l'activation des macrophages. Peu d'études se sont intéressées à leur rôle physiologique dans le TME sur l'induction du phénotype des TAMs, qui nécessite ainsi d'être plus approfondi.

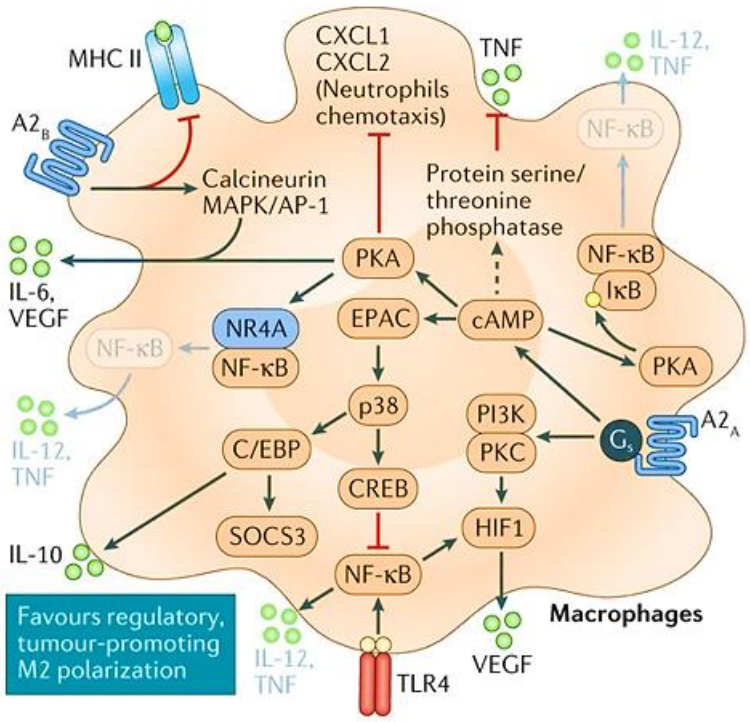


Figure 30 - Modulation des voies de signalisation d'activation des TAMs par l'adénosine. L'adénosine présent au sein du microenvironnement tumoral (TME), agit principalement via son récepteur A2A. L'activation de dernier induit la voie de signalisation couplé aux protéines Gs, aboutissant à l'accumulation d'AMP cyclique (AMPc) et son effecteur la protéine kinase A (PKA). Ces derniers régulent alors d'une part négativement la voie NF-κB et la sécrétion de chimiokines permettant le recrutement des neutrophiles, et d'autre part régulent positivement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et angiogéniques. De plus, le récepteur A2B activé impacte la présentation de l'antigène, par inhibition des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (MHC II). L'ensemble induit le macrophage à adopter un phénotype anti-tumoral (547).

2.4.2.4.3. Ciblage thérapeutique des récepteurs purinergiques dans le TME

L'adénosine étant le plus décrit dans les mécanismes induisant l'immunosuppression du TME, le ciblage de ses récepteurs ainsi que des enzymes CD39 et CD73 sont les plus étudiés comme approches thérapeutiques. Par exemple, dans un modèle murin de sarcome, l'inhibition pharmacologique du récepteur A2A a permis d'améliorer la réponse anti-tumorale médiée par les cellules T et la régression tumorale (557). Allard et *al*. ont quant à eux montré que sur un modèle murin de mélanome surexprimant CD39, les métastases hépatiques et pulmonaires s'établissent beaucoup plus rapidement en comparaison avec les modèles murins déficients en CD39 (571). Il serait intéressant de déterminer si l'effet anti-tumoral ainsi induit dans les deux cas est médié par une modulation du phénotype des macrophages. Dans ce contexte, d'Almeida et *al*. ont révélé que l'inhibition de l'activité de CD39 par le polyoxométalate 1 (POM-1) abroge la production d'IL-10 par les TAMs et réduit leurs fonctions immunosuppressives, sur

un modèle de TAMs isolés de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (572). De même, Perrot et *al*. ont montré que les anticorps ciblant CD39 et CD73 humains favorisent l'immunité anti-tumorale par la stimulation des DC et des macrophages, qui à leur tour, rétablissent l'activation des cellules T effectrices (573). Une autre étude a permis de montrer que le ciblage de CD39 par anticorps induit une augmentation des niveaux d'ATP, qui au niveau des cellules myéloïdes mène à l'activation de la voie P2X7/NLRP3/IL-18, conduisant à une hausse d'infiltration des cellules T $CD8^+$ (574). Cette dernière étude démontre ainsi un rôle du récepteur purinergique P2X7 dans la modulation de la réponse anti-tumorale et notamment médiée par les macrophages.

En effet, parmi les récepteurs purinergiques P2, les récepteurs P2X7 représentent les cibles les plus avancées en termes de thérapie anticancéreuse (543). L'utilisation d'antagonistes spécifiques du récepteur P2X7 a été encouragée pour traiter les cancers, du fait de leur effet sur l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales (575). Cependant, il a également été montré que l'expression du récepteur P2X7 par les cellules immunitaires, freine la croissance tumorale (575,576). Leur activation au sein du TME en présence de concentration élevée d'ATP extracellulaire permet notamment d'induire des fonctions anti-tumorales aux macrophages, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix. Douguet et *al.* ont ainsi montré qu'une petite molécule activatrice de P2X7 cible en particulier les macrophages et les DC exprimant le récepteur P2X7. Ils ont révélé que le récepteur P2X7 ainsi activé, stimule la réponse immunitaire en libérant les fonctions effectrices des cellules T. Ils ont démontré que cet effet est dépendant de la sécrétion d'IL-18 à la suite de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (577) majoritairement dans les cellules dendritiques, mais les macrophages semblent également impliqués (578). Des études plus approfondies, notamment sur les fonctions des macrophages ainsi induites après activation du récepteur P2X7 sont nécessaires pour incriminer ou non la reprogrammation des macrophages dans l'effet thérapeutique observé. Outre les récepteurs P2X7, le récepteur purinergique P2Y12 peut aussi être ciblé pour induire une réponse anti-tumorale, médiée par les macrophages. Il a été montré que l'inhibition pharmacologique de P2Y12 par le ticagrelor augmente la phagocytose des cellules tumorales par les macrophages et induit un phénotype anti-tumoral. Cet effet est médié par l'activation des voies de stress du réticulum endoplasmique (579).

Pour conclure, les récepteurs purinergiques jouent un rôle dans la modulation d'un grand nombre d'activités biologiques des macrophages. La régulation de leur signalisation permet notamment d'impacter l'activité fonctionnelle de ces cellules immunitaires. Dans un contexte tumoral, au sein du TME une libération importante d'ATP et d'adénosine conduit à un microenvironnement tumoral immunosuppresseur. Au niveau des TAMs, il a beaucoup été décrit les effets de l'adénosine sur l'induction d'un phénotype anti-tumoral. Les récepteurs P2 pouvant également moduler l'activation des macrophages, leur rôle au sein du TME sur le phénotype des TAMs reste à être défini plus clairement. Ainsi le ciblage de cette signalisation purinergique peut constituer un axe thérapeutique permettant de moduler l'activation des

macrophages dans le cancer. Par ailleurs, la radiothérapie pouvant également moduler la reprogrammation des macrophages et induisant une forte concentration d'ATP dans le TME, des stratégies de combinaisons thérapeutiques entre RT et récepteur purinergique semblent pertinentes dans l'optique de potentialiser la reprogrammation des macrophages. Dans ce contexte, ce travail de thèse a consisté à étudier la combinaison de RT et du récepteur purinergique P2Y2 à améliorer la reprogrammation radio-induite des macrophages.

OBJECTIFS

Au sein du microenvironnement tumoral (TME), les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont majoritairement présents et associés à un mauvais pronostic dans la plupart des cancers (217–220). Ces cellules font preuve d'une grande plasticité fonctionnelle et ont la capacité à adopter divers états d'activation selon les stimuli de leur microenvironnement (135). Etant donnée que les TAMs présentent un phénotype immunosupresseur (216), la reprogrammation fonctionnelle de ces macrophages aux fonctions pro-tumorales vers des macrophages aux propriétés immunostimulatrices et anti-tumorales, s'est imposée comme une stratégie thérapeutique pour réguler l'immunosuppression du TME et favoriser le développement d'une réponse anti-tumorale efficace.

La radiothérapie est un traitement majeur du cancer pour la plupart des tumeurs solides (285). Initialement utilisée pour sa capacité à provoquer la mort ou la sénescence des cellules cancéreuses, la radiothérapie est aujourd'hui également utilisée pour stimuler les réponses immunologiques anti-tumorales. En particulier, il a été récemment démontré la capacité des radiations ionisantes à induire une reprogrammation des TAMs vers un phénotype pro-inflammatoire anti-tumoral (274). De plus, notre équipe a initié la caractérisation des voies de signalisation activées dans cette reprogrammation radio-induite des TAMs (424). Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant cette activation anti-tumorale des macrophages est nécessaire afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie.

C'est dans ce contexte, que mes travaux de thèse avaient pour objectifs (i) de poursuivre la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la reprogrammation radio-induite des macrophages et (ii) d'identifier de nouvelles cibles moléculaires inhibitrices de la reprogrammation pro-inflammatoire radio-induite des macrophages, afin (iii) de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques combinatoires permettant d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie.

Purinergic receptor P2Y2 inhibition enhances NLRP3 transcription and ionizing radiation-mediated proinflammatory macrophage activation

Aurélia Deva Nathan[1,2,3], Ali Mostefa-Kara[1,2,3], Audrey Paoletti[1,2], Anais Chapel[1,2], Emie Gutierrez-Mateyron[1,2], Thanh Trang Cao-Pham[1,2], Awatef Allouch[1,2] and Jean-Luc Perfettini[1,2,*]

[1] Université Paris-Saclay, Inserm UMR1030, Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, Villejuif, 94805, France;
[2] Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;
[3] These authors contributed equally

[*] Correspondence to:

Dr. Jean-Luc PERFETTINI
Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation,
INSERM UMR1030
Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy,
114 rue Edouard Vaillant
F-94805 Villejuif, France
Tel. 33-1-42 11 54 24
Fax 33-1-42 11 52 36
e-mail : jean-luc.perfettini@gustaveroussy.fr

Abstract

The reprogramming of tumor-associated macrophages (TAMs) by radiotherapy is associated with cancer patient's response and sensitization to immune checkpoint blockade, but the molecular mechanisms involved remain largely unknown. Here, we show that following ionizing radiation (IR), macrophages accumulate single and double strand-DNA breaks, fragmented mitochondria and the DNA sensor cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) in their cytosol. We demonstrate that mitochondrial fragmentation is induced by the activation of the dynamin-related protein 1 (DRP1) and controls the stabilization of cGAS and the proinflammatory activation of irradiated macrophages. Furthermore, pharmacological and genetic inhibitions of cGAS impair the proinflammatory activation of irradiated macrophages, thus revealing that cGAS is a central effector of IR-mediated proinflammatory activation. Interestingly, we also report that the purinergic receptor P2Y2 acts as an endogenous repressor of the proinflammatory macrophage activation through the negative regulation of NLRP3 transcription and demonstrate that P2Y2 inactivation enhances the ability of irradiated macrophages to undergo proinflammatory activation. Our results thus define a new signaling pathway elicited by IR directing mitochondrial dynamic, cytosolic DNA recognition by cGAS and macrophage proinflammatory phenotype, which is enhanced following P2Y2 inactivation.

Introduction

Every year, half to thirty percent of cancer patients are treated worldwide with radiotherapy alone or in combination with other cancer treatments such chemotherapies and surgery (1). Despite the central place of radiotherapy in the armamentarium available to clinicians for cancer treatment, the cellular and molecular mechanisms responsible for the effectiveness of radiotherapy are partially understood. In response to IR, cancer cells can be directly eliminated through the induction of distinct cell-autonomous death (CAD) or non-cell-autonomous death (NCAD) modalities (including apoptosis (2), autophagic cell death (3), necroptosis (4), methuosis (5), cellular cannibalism (6), ferroptosis (7) and mitotic catastrophe (8)) or senescence (9). These cytotoxic processes can also be associated with the release of immunogenic damage-associated molecular patterns (DAMPs) (such as adenosine triphosphate (ATP) (10) and high mobility group box 1 (HMGB1) (11, 12)) and the induction of both intracellular and extracellular immune-stimulatory signals (such as cytosolic single- or double-strand DNA breaks (13) and type I Interferon β (IFN-β) (14)) that support the development of an effective antitumor immune response. IR can also modulate functions of non-cancerous cells of the tumor microenvironment (TME) (including endothelial cells, cancer-associated fibroblast and immune cells) (15), reshape the architecture of TME and trigger associated immune-modulatory effects (16).

TAMs are major cellular components of TME that support in the vast majority of cancers, tumor immune evasion through anti-inflammatory activation (17) and tumor phagocytosis defectiveness (18), thus promoting cancer progression and resistance to cancer treatments (19). The abrogation of macrophage immunosuppressive activities with immunotherapeutic approaches such as monoclonal antibodies against CD47 (20), PI3Kγ inhibitor (21) or functionalized nanoparticles (22) reveals that the proinflammatory reprogramming of TAMs directs tumor response and better clinical outcomes. Radiotherapy was initially revealed for its ability to reshape TME through vasculature normalization and indirect proinflammatory reprogramming of TAMs (23). We demonstrated that IR also directly acts on TAMs and induces their functional reprogramming from anti-inflammatory to proinflammatory phenotype (24). This cell-autonomous process implies the activation of the NADPH oxidase 2 (NOX2), the ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and the interferon related factor 5 (IRF5). The inhibition of this proinflammatory signaling is associated with the poor tumor response to preoperative adjuvant radiotherapy in locally advanced rectal cancer (24), thus supporting the idea that therapeutic proinflammatory reprogramming of TAMs should help to improve radiotherapy efficacy. Here, we further explored molecular and cellular mechanisms involved in the regulation of IR-mediated proinflammatory macrophage activation.

Results

Cytoplasmic DNA breaks and cGAS accumulate in irradiated macrophages during proinflammatory activation.

Considering the ability of IR to induce the release of genomic or mitochondrial DNA into the cytosol of irradiated cells (25, 26) and as a consequence, to regulate central macrophage functions such as antigen presentation (27) and cytokine secretion (28), the accumulation of single-stranded (ss) and double-stranded (ds) DNA breaks in the cytosol of macrophages during IR-mediated proinflammatory activation was analyzed. Phorbol myristate acetate (PMA)-differentiated human THP1 macrophages were irradiated with a single dose of 2 Gy and analyzed using fluorescence microscopy. After 30 minutes, cytosolic puncta containing dsDNA breaks accumulated in approximately 35% of 2 Gy-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 1A, B), as compared to control, non-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages. Interestingly, ssDNA-containing puncta were also detected in the cytosol of 50% of 2 Gy-irradiated, PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 1C, D), underlining the fast accumulation of both ssDNA and dsDNA fragments in the cytosol of irradiated macrophages. To determine whether the accumulation of cytosolic DNA fragments could mirror the increased DNA damage detected in the nucleus of irradiated macrophages, as we previously reported (24), the phosphorylation of the histone variant H2AX on serine 139, also known as γ-H2AX, was studied by fluorescence microscopy 1 hour after the irradiation of PMA-differentiated human THP1 macrophages with a single dose of 2 Gy. Approximately 50% of 2 Gy-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages exhibited nuclear γ-H2AX^{+} foci (Supplementary Fig. 1A), as compared to control, non-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages, thus suggesting that the cytosolic accumulation of DNA fragments is associated with the induction of nuclear DNA damage in irradiated macrophages. The expression level of cGAS, which plays a central role in various biological processes elicited by IR, such as type I interferon secretion (14, 29), the induction of senescence (30) and the activation of innate immunity (13), was also determined using western blots. The increased expression levels of cGAS in 2 Gy-irradiated, murine RAW264.7 macrophages (Fig. 1E) or PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 1F), 3 hours and 6 hours after irradiation were detected respectively, as compared to control, non-irradiated cells. Ninety-six hours after a single dose of 2 Gy, the increased expression levels of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the interferon regulatory factor 5 (IRF5), which are two proinflammatory markers of macrophage activation (31, 32), were detected in PMA-differentiated human THP1 macrophages. As previously published (24), we confirmed using fluorescence microscopy that 24 hours after a single-dose of 2 Gy, the frequency of irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages expressing iNOS is significantly increased (Fig. 1G, H), as compared to control PMA-differentiated human THP1 macrophages. Accordingly, the increased expression level of IRF5 is also detected using western blots at 96 hours in 2 Gy-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 1I), as compared to control PMA-differentiated THP1 macrophages. Of note, we detected the expression level of IRF5 after 6 hours in 2 Gy-

irradiated murine RAW264.7 macrophages by western blots (Fig. 1J) and thus revealed that the increased expression level of cGAS occurs before the proinflammatory activation of irradiated macrophages. To determine whether the increased expression level of cGAS can be detected during proinflammatory macrophage activation, we analyzed cGAS expression level in response to interferon γ (IFN-γ stimulation. Using western blots, the expression levels of cGAS and IRF5 were detected in PMA-differentiated human THP1 macrophages that were stimulated for 72 hours with recombinant human IFN-γ The increased expression levels of cGAS (Supplementary Fig. 2A) and IRF5 (Supplementary Fig. 2B) were observed in IFN-γ-stimulated, PMA-differentiated human THP1 macrophages, as compared with control macrophages, thus suggesting that cGAS increased expression level might be also required for canonical proinflammatory activation of macrophages. Altogether, these results reveal that cytosolic DNA breaks and cGAS accumulate in macrophages during IR-mediated proinflammatory activation.

Dynamin related protein 1 (DRP1)-mediated mitochondrial fragmentation dictates IR-mediated proinflammatory macrophage activation through cGAS-dependent mechanism.

Considering the central role of mitochondrial fusion/fission cycles, also referred as mitochondrial dynamics, for metabolism regulation and proinflammatory activation of macrophages (33), the shape of mitochondria in PMA-differentiated human THP1 macrophages that were irradiated with a single dose of 2 Gy was evaluated by determining, using confocal microscopy, the expression of the translocase of the outer mitochondrial membrane 20 (TOM20). After a single dose of 2 Gy, PMA-differentiated human THP1 macrophages exhibited a disturbed mitochondrial network and accumulated rounded, fragmented mitochondria in their cytosol (Fig. 2A), as compared to control macrophages that mainly showed an interconnected and filamentous mitochondrial network. The frequency of macrophages showing a fragmented mitochondrial network significantly increased 30 minutes after 2 Gy single-dose irradiation (Fig. 2B), as compared to control macrophages, thus revealing that mitochondrial fragmentation is rapidly induced after IR. To characterize molecular mechanisms regulating mitochondrial fragmentation in irradiated macrophages, the role of the dynamin-related protein 1 (DRP1), which is a central dynamin-related GTPase involved in the regulation of mitochondrial fission (34, 35), was evaluated during IR-mediated proinflammatory activation. Using western blots, the activating phosphorylation of DRP1 on serine 616 (DRP1S616*) was determined in 2 Gy-irradiated murine RAW264.7 macrophages (Fig. 2C) and PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 2D). The increased expression levels of DRP1S616* were observed 6 hours after the irradiation of murine RAW264.7 macrophages (Fig. 2C) or PMA-differentiated THP1 macrophages (Fig. 2D), respectively. We then appreciated the role of DRP1 activation during IR-mediated mitochondrial fragmentation and uncovered that the pharmacological DRP1 inhibitor Mdivi1 impairs the mitochondrial fragmentation detected 30 minutes after the irradiation of PMA-differentiated human THP1 macrophages with a single dose of 2 Gy (Fig. 2E-G), thus demonstrating that DRP1 dictates

mitochondrial fragmentation in irradiated macrophages. Considering the ability of mitochondrial dynamics to cause cytosolic DNA accumulation directly as a result of mitochondrial DNA leakage (36) or indirectly after mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and genomic alteration (37), the effect of pharmacological or genetic inhibition of DRP1 on the increased expression level of cGAS detected 6 hours after 2 Gy single dose irradiation of PMA-differentiated human THP1 macrophages was analyzed. We observed using western blots that the depletion of DRP1 with specific small interfering RNA (siRNA) (Fig. 2H) abrogated the increase of cGAS expression level detected 6 hours after the treatment of irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages, thus revealing that the increase of cGAS expression level detected in irradiated macrophages depends on DRP1 activation. Finally, the role of cGAS during the IR-mediated proinflammatory macrophage activation was evaluated using confocal microscopy and western blots. PMA-differentiated human THP1 macrophages were irradiated with a single dose of 2 Gy in presence of the pharmacological inhibitor of human cGAS G140 and analyzed for iNOS, γ-H2AX and IRF5 expressions. G140 impaired the increased expression levels of iNOS (Fig. 2I, J) and IRF5 (Fig. 2K) observed 24 hours (Fig. 2I, J) and 96 hours (Fig. 2K) after IR, respectively, without affecting the accumulation of γ-H2AX^{+} foci in the nucleus of 2 Gy-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 2I). These results indicate that cGAS acts downstream DNA damage induction in the IR-mediated proinflammatory signaling pathway that we previously described (24). The pharmacological inhibition of murine cGAS with the use of RU521 also impaired the increased expression level of IRF5 detected 6 hours after the irradiation of murine RAW264.7 macrophages with a single dose of 2 Gy (Fig. 2L). Accordingly, the specific depletion of cGAS using siRNA abrogated the increased expression level of IRF5 detected 96 hours after 2Gy single-dose irradiation of PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 2M), confirming thus the central role of cGAS in the proinflammatory activation of macrophages elicited in response to IR.

Purinergic receptor P2Y2 is an endogenous repressor of proinflammatory macrophage activation

In attempt to identify combinatorial strategies to enhance IR-mediated proinflammatory activation of macrophages, we focused on the purinergic receptor P2Y2, which is membrane-anchored receptor that bind extracellular nucleotides (such as adenosine triphosphate (ATP) and uridine triphosphate (UTP)) and can regulate several macrophage functions including chemotaxis (38) and cytokine secretion (39, 40). The impact of P2Y2 inactivation on the functional reprogramming of macrophages was then investigated (41). Pharmacological inhibition of P2Y2 with Kaempferol (a specific P2Y2 inhibitor) promoted classical activation of anti-inflammatory human monocyte derived macrophages (hMDMs), as revealed by the induction of known human markers of macrophage activation such as tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β), and interferon regulatory factor 5 (IRF5) and the reduced expression of anti-inflammatory markers such as CD163 and interleukin 10 (IL-10) (Fig. 3A). Moreover, P2Y2 inhibition with Kaempferol induced classical macrophage activation to the

same extent as the positive control, interferon-γ (IFNγ) (Fig. 3B) or another purinergic receptor P2Y2 inhibitor, AR-C118925XX (Fig. 3C), as revealed by the increased expression of IRF5 (Fig. 3B, C). P2Y2 depletion by means of siRNAs (Fig. 3D-H) or short hairpin interfering RNA (shRNA) (Fig. 3I) increased expression levels of IRF5 (Fig. 3E, G-I). A diminished membrane expression of the alternative macrophage activation marker CD163 (Fig. 3J, K) was detected on Kaempferol-treated hMDMs (Fig. 3J, K). A reduced secretion of the cytokine interleukin-10 (IL-10) from PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 3L, N) or hMDMs (Fig. 3M) that were treated with Kaempferol (Fig. 3L, M) or depleted for P2Y2 (Fig. 3N) was also observed. These results indicate that P2Y2 acts as an endogenous repressor of proinflammatory macrophage activation.

P2Y2 inhibition directs the proinflammatory macrophage activation through the modulation of NLRP3 transcription.

We previously reported that purinergic receptor P2Y2 can interact with the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing (NLR) family member NLRP3 (42) and modulate the early steps of human immunodeficiency virus type (HIV-1) or severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-COV-2) infection (42, 43). P2Y2 was shown to regulate NLRP3 ubiquitination and expression through the modulation of E3 ubiquitin ligase CBL activity (42). More recently, P2Y2 was also shown to act as an endogenous repressor of NLRP3 inflammasome activation (44). In this context and to deeper characterize effects of P2Y2 inactivation on macrophage functions, NLRP3 protein and mRNA expression levels were analyzed after P2Y2 depletion. P2Y2 depletion by means of siRNAs (Fig. 4A, B, D, E) or shRNA (Fig. 4C, F) increased protein (Fig. 4A-C) and mRNA (Fig. 4D-F) expression levels of NLRP3 in murine RAW264.7 macrophages (Fig. 4A, D) and PMA-differentiated human THP1 macrophages (Fig. 4B, C, E, F), thus revealing that P2Y2 inhibits NLRP3 transcription. The contribution of NLRP3 to the proinflammatory activation of macrophages that were depleted for P2Y2 was then evaluated. Control and P2Y2-depleted PMA-differentiated human THP1 macrophages were silenced for NLRP3 expression and analyzed for IRF5 expression. Interestingly, the increased expression level of IRF5 detected after P2Y2 depletion was impaired in macrophages subjected to NLRP3 silencing (Fig. 4G), thus demonstrating that P2Y2 depletion triggers the proinflammatory activation of macrophages through the transcriptional regulation of NLRP3 expression.

P2Y2 depletion enhances IR-mediated proinflammatory activation of macrophages.

Then, the ability of P2Y2 inhibition to enhance IR-mediated proinflammatory macrophage activation was evaluated. The effects of P2Y2 inhibition on the accumulation of DNA breaks and fragmented mitochondria in the cytosol of 2Gy-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages were first studied. We observed that P2Y2 inhibition alone is sufficient to induce the accumulation of both ssDNA and dsDNA fragments in the cytosol of P2Y2-depleted macrophages (Fig. 5A-D). Despite the fact that the frequency of macrophages showing dsDNA-positive puncta did not vary between macrophages depleted for P2Y2 that were irradiated or

not with a single dose of 2 Gy (Fig. 5D), the frequency of macrophages showing ssDNA-positive puncta was higher in 2Gy-irradiated macrophages that were depleted for P2Y2 than in 2Gy-irradiated control macrophages (Fig. 5B). As shown in Figures 1 and 2, the cytosolic accumulation of DNA breaks positively correlates with the presence of fragmented mitochondria detected in 2Gy-irradiated macrophages, in P2Y2-depleted macrophages and in 2Gy-irradiated macrophages that were depleted for P2Y2 (Fig. 5E, F). Interestingly, we also revealed that P2Y2 depletion or 2Gy single-dose irradiation alone increased the frequency of macrophages expressing iNOS (Fig. 5G) and showed that P2Y2 depletion significantly increased the ability of 2Gy-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages to express iNOS (Fig. 5G, H), as compared to control (shCo.) or 2Gy-irradiated (IR) control (shCo.) PMA-differentiated human THP1 macrophages. Altogether, these results demonstrate that P2Y2 inhibition enhances the ability of irradiated macrophages to undergo proinflammatory activation.

Discussion

Despite the fact that radiotherapy is a cornerstone of cancer treatment, the molecular and cellular bases of radiotherapy efficacy are still poorly understood and the characterization of antitumor immune-modulatory activities elicited by radiotherapy is under intensive investigations. We previously demonstrated that IR promotes the proinflammatory activation of macrophages in a cell-autonomous manner through the increased expression of the NADPH oxidase 2 (NOX2) and ROS production (24). Oxidative stress causes DNA damages in the nucleus of irradiated macrophages and leads to the activation of the Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) kinase and subsequent the proinflammatory activation of irradiated macrophages (24). We also reported that the inhibition of this signaling pathway impairs the proinflammatory activation of macrophages and predicts tumor response to hypofractionated radiotherapy in locally advanced rectal cancer (24), thus confirming that the reprogramming of anti-inflammatory tumor-associated macrophages (TAMs) into proinflammatory macrophages is associated with the efficacy of radiotherapy. In this context and to identify novel cellular targets for the improvement of radiotherapy efficacy, we further explored molecular mechanisms regulating the proinflammatory activation of macrophages in response to IR.

In this paper, we show that IR rapidly triggered the cytosolic accumulation of single and double stranded DNA breaks and DNA sensor cGAS in irradiated macrophages, thus suggesting that cGAS may sense IR-induced self-DNA breaks that accumulated in cytosol of irradiated macrophages and potentially participate to the proinflammatory activation of irradiated macrophages. To determine the causal relationship between the cytosolic accumulation of self-DNA and proinflammatory macrophage activation, the role of cGAS in this process was studied. Our results revealed that in response to IR, cGAS induces the increased expression of iNOS and IRF5 and thus, favors the proinflammatory activation of macrophages. Our results are consistent with previous publication revealing that cytosolic DNA sensing by cGAS governs macrophage proinflammatory activation in myocardial ischemic injury (45). Interestingly, cGAS inhibition did not affect the accumulation of γ-H2AX-containing nuclear foci, thus indicating that cGAS may act after the induction of DNA damage and the ATM-dependent DNA damage response that we previously involved in the IR-mediated proinflammatory macrophage activation (24). Considering that the recognition of cytosolic DNA (46) and the increased abundance of cGAS mRNA (45) can both lead the increased expression level of cGAS, further investigations are needed to define the molecular mechanisms involved in the upregulation of cGAS expression levels detected in response to IR.

We also noticed that fragmented mitochondria accumulated in macrophages upon irradiation, suggesting that macrophage mitochondrial dynamic can be affected by IR and may potentially contribute to the proinflammatory activation of macrophages. The increased activating phosphorylation of the major pro-fission protein DRP1 (DRP1S616*) was detected rapidly after the irradiation of macrophages. Moreover, the pharmacological inhibition and the depletion of

DRP1 respectively reduced mitochondrial fragmentation and cGAS expression levels in irradiated macrophages, thus highlighting that DRP1 activation is required for IR-mediated mitochondrial fragmentation and dictates cGAS expression level during proinflammatory activation of irradiated macrophages. Our results are in line with the ability of DRP1 to promote mitochondrial fragmentation and regulate the secretion of IL-12, IL-6 and IL-1β during LPS-induced proinflammatory macrophage activation (47). Considering the ability of protein kinase C delta (48), cyclin-dependent kinases 1 (CDK1) and 5 (CDK5) (48, 49), calcium–calmodulin (CaM)-dependent protein kinase II (50), extracellular signal regulated kinase ERK2 (51) and PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) (52) to induce DRP1S616* phosphorylation, their contribution to IR-mediated proinflammatory macrophage activation remain to be addressed. Moreover, molecular mechanisms linking DRP1-dependent mitochondrial fragmentation and the increased expression levels of cGAS expression remain to be defined. Our results also reveal that cGAS supports IR-mediated proinflammatory macrophage activation, corroborating recent results showing that the cGAS regulates mTORC1 pathway and controls proinflammatory macrophage activation during sepsis-induced lung injury (53) or that the activation of STING with the agonist DXMAA promotes a shift from anti-inflammatory to proinflammatory phenotype of TAMs (54). Accordingly, a particular attention should be paid to the messenger 2′,3′-cGAMP, the kinase STING, other transcription factors such as IRF3 and NF-κB and the type 1 interferon secretion (particularly IFN-β) that are known to act downstream to cGAS (46, 55-57). Our findings thus provide insights into the role of cGAS during radiotherapy and demonstrate that IR triggers a proinflammatory signaling pathway in macrophages involving DRP1S616*, mitochondrial dynamic, cytosolic DNA fragments, cGAS and IRF5. The crosstalk between this signaling pathway and the molecular cascade (involving NOX2, ROS production, ATMS1981* and IRF5) that we previously identified (24), need to be addressed. Considering that ATM kinase was shown to restrain spontaneous type I Interferon (58), its contribution to IR-mediated proinflammatory macrophage activation need further investigations.

Our results also provide strong evidence that purinergic receptor P2Y2-mediated signaling pathways play a central role in the repression of proinflammatory macrophage activation. Pharmacological inhibition (with Kaempferol or ARC-119825XX) or depletion of P2Y2 promotes the proinflammatory activation of PMA-differentiated human THP1 macrophages and murine RAW264.7 macrophages. More importantly, the inactivation of P2Y2 reprogrammed anti-inflammatory hMDMs to proinflammatory hMDMs, thus revealing that P2Y2-mediated signaling pathways negatively regulate the switch from anti-inflammatory macrophages to proinflammatory macrophages. Our results are consistent with the effects of pharmacological and macrophage-specific genetic inhibition of the β-catenin (59), the PI3-kinase γ (21, 60) or the transcription factor c-MYC (61), which are critical for the anti-inflammatory reprogramming of macrophages. Considering that purinergic receptor P2Y2 has been involved in regulation of biological activities of β-catenin (62), c-MYC (63) and the PI3K/AKT-dependent signaling pathway (64, 65), further investigations should analyze effects of P2Y2 inactivation on the

transcriptional activation of FOS-like antigen 2 (FOSL2) and NFκB, and on the repression of the AT-rich interaction domain 5A (ARDI5A) or C/EBPβ, which are critical for macrophage functional reprogramming elicited by the inhibition of β-catenin, the PI3-kinase γ or c-MYC (21, 59, 61). In this study, we also demonstrate that P2Y2 acts as endogenous repressor of NLRP3 transcription. Furthermore, P2Y2 depletion directs the proinflammatory macrophage activation in an NLRP3-dependent manner. Despite NRLP3 activation was involved in the interferon regulatory factor 4 (IRF4)-dependent IL-4 transcription in anti-inflammatory macrophages obtained for asthmatic mice and patients (66), the contribution of NLRP3 to macrophage activation is poorly addressed and further studies are required to decipher molecular mechanisms involved in the regulation of macrophage reprogramming by NLRP3.

Others and we proposed that the reprogramming of TAMs with IR alone or in combination with other modalities of cancer treatments (such as PARP inhibitors (67) or functionalized nanoparticles (68)) might enhance the efficacy of radiotherapy (15). Accordingly, the identification of novel mechanisms regulating macrophage functions could help to identify novel components whose therapeutic modulations should improve the proinflammatory activation of macrophages and the efficacy of radiotherapy. Here, we identify P2Y2 as an endogenous repressor of proinflammatory macrophage activation and demonstrated that the combination of IR with P2Y2 inactivation enhanced the ability of macrophages to accumulate dsDNA breaks and fragmented mitochondria in their cytosol and to be proinflammatory activated in response to IR. Our results suggest that combinatorial strategies involving IR and P2Y2 inactivation should stimulate the proinflammatory signaling pathway (involving NLRP3, DRP1S616*, mitochondrial dynamic, cytosolic DNA fragments, cGAS and IRF5) that we described above. Further molecular characterizations are needed to precise the molecular cascade involved in this process. Beside these functional considerations, the identification of innovative therapeutic strategies allowing the specific inhibition of P2Y2 in TAMs might help to improve patient's response to radiotherapy and have the potential to synergize with other cancer treatments such as immunotherapies.

Materials and methods

Cells and Reagents

The human monocytic THP1 cell line and murine RAW264.7 macrophages were respectively cultured in RMPI-1640-Glutamax medium (Life Technologies, USA) and DMEM-Glutamax medium (Life Technologies, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HI FBS) (Hycultec GmbH, Germany) and 100 IU/ml penicillin–streptomycin (Life Technologies). Cells were maintained at 37 °C under 5% CO2 humidified atmosphere. Human THP1 cells were differentiated into THP1 macrophages with 320 nM of PMA (#tlrl-PMA, Invivogen, USA) during 24 hours and cultured for additional 24 hours before use. Human monocyte-derived macrophages (hMDMs) were obtained and differentiated as previously described (69). Kaempferol (#K0133) and ARC-118925XX (#4890) were obtained from Sigma-Aldrich and Tocris, respectively. Recombinant Human IFN-γ (IFN-γ, #285-IF/CF) was from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Mdivi-1 (#S7162) was from Selleckchem (Houston, TX, USA). G140 (#inh-g140) and RU521 (#inh-ru-521) were from Invivogen (USA).

Antibodies

Antibodies used for immunofluorescence were anti-phospho-H2AX (Ser139) (#05-636) antibody from EMD Millipore (Billerica, MA, USA), anti-iNOS (#ab3523) and anti-dsDNA (#ab27156) antibodies from Abcam (Cambridge, UK), anti-Tom20 (F-10) (#sc-17764) antibody from Santa Cruz Biotechnology (Oregon, USA) and anti-DNA, single stranded specific, clone F7-26 (MAB3299) antibody from Merck (Darmstadt, DE). For western blots, anti-cGAS (D1D3G) (#15103), anti-cGAS (D3O8O) (#31659), anti-Phospho-DRP1 (Ser616) (#3455) antibodies were from Cell Signaling Technology. Anti-P2Y2 antibody (#APR-010) and anti-NLRP3 (#ag-20b-0014) antibody were from Alomone laboratories and AdipoGen, respectively. Anti-IRF5 (#ab21689) and anti-beta Actin HRP [AC-15] (#ab49900) antibodies were from Abcam, and anti-GAPDH (#MAB374) antibody was from BD bioscience. Anti-CD163 Alexa Fluor 647 (#562669) was from BD Pharmingen.

Irradiation

As described above, human THP1 cells were differentiated into macrophages with 320 nM of PMA (Invivogen, #tlrl-PMA) in 12-well plates (10^6 cells/well) or in 24-well plates ($5x10^5$ cells/well). Murine RAW264.7 macrophages were seeded in 24-well plates ($5x10^4$ cells/well) 24 hours before treatments. Macrophages were then irradiated with a single dose of 2 Gy in presence or in absence of indicated pharmacological inhibitors or after indicated knockdowns with X-ray irradiator (1 Gy/min, X-RAD 320, Precision X-Ray) and harvested at 30 minutes, 1 hour, 6 hours, 24 hours or 96 hours after irradiation for western blot and/or immunofluorescence analyses.

siRNA and shRNA for gene silencing

PMA-differentiated human THP1 macrophages were transfected using specific siRNAs for human P2Y2 (siP2Y2.1 et siP2Y2.2), human NLRP3 (siNLRP3.1 et siNLRP3.2) or control siRNAs (siControl) from Sigma, SMARTpool siGENOME Human MB21D1 (115004) siRNAs (M-015607-01-0005) for cGAS, ON-TARGET plus Human DNM1L (10059) siRNAs for DRP1, siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #2 (D-001206-14-05) or ON-TARGET plus Non-targeting Pool (D001810-10-05) as controls from Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Murine RAW264.7 macrophages were transfected using control siRNA (siControl) or specific siRNA for murine P2Y2 (siP2Y2.1) from Sigma. Transfections used Lipofectamine RNAi max (#13778150, Life Technologies, Illkrich, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the Lipofectamine RNAi max and siRNA were mixed in Opti-MEM medium (Thermo Fisher Scientific) without serum and incubated at room temperature for 5 minutes. The transfection mix was then added to PMA-differentiated human THP1 macrophages or murine RAW264.7 macrophages for 48 hours at 37 °C. After 48 hours, the medium was replaced by fresh medium supplemented with 10% FBS and transfected macrophages were irradiated. For the transfection of hMDMs, smart pools of siGenome non-targeting control and P2Y2 specific siRNAs (siP2Y2.3) were obtained from Dharmacon and used as previously described (24, 42, 70). Control (shControl) and P2Y2-depleted (shP2Y2) THP1 monocytes were also used as previously described (42). Sequences of human siRNAs, siGENOME SMARTpool and shRNAs used in this study are shown in Supplementary Table 1 and sequences of murine siRNAs are shown in Supplementary Table 2.

Immunofluorescence microscopy and flow cytometry

PMA-differentiated human THP1 macrophages were cultured on coverslips and fixed after treatment with 4% (w/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Germany) in DPBS (Gibco, #14190-094) for 5 minutes. Macrophages were permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, #XXX,) in DPBS for 5 minutes at room temperature, washed in DPBS and blocked with 10% HI FBS in DPBS for 1 hour. Macrophages were then incubated with primary antibodies in 10% HI FBS in DPBS for 2 hours, washed with D PBS and incubated with the secondary antibodies Alexa Fluor 488 (Invitrogen, #A11034) or Alexa Fluor-546 (Invitrogen, #A11030) and Hoechst 33342 (Invitrogen, #1874027) in DPBS containing 10% HI FBS for 30 minutes at room temperature. Coverslips were mounted with Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) on microscope slides (Thermo Fisher Scientific) and examined with Leica TCS SPE confocal microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) using a X63 oil objective, as previously described (69). hMDMs (10^6 cells/mL) were harvested after indicated treatments in RPMI complete medium, washed with DPBS, saturated at 4°C for 20 minutes in DPBS containing 10% HI FBS and incubated with anti-CD163 Alexa Fluor 647 (BD Pharmingen, #562669) antibody for 1 hour and 30 minutes. Membrane expression of CD163 was then analyzed using LSRFortessa (BD) flow cytometer.

Western blot analysis

Western blots were performed as previously published (24, 42, 69, 70). Total cellular proteins were extracted from treated or transfected PMA-differentiated human THP1 macrophages, murine RAW264.7 macrophages or hMDMs in lysis buffer containing 1 M TRIS (pH = 7.4), 5 M NaCl, 0.1% CHAPS, and protease and phosphatase inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). 3-15 µg of protein extracts were run on 10%, 12% or 4-12% NuPAGE gels (Invitrogen, Illkrich, France) and transferred onto 0.2 µm pore nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Marnes-la-coquette, France) at room temperature. After saturation with in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% bovine serum albumin, membranes were incubated with indicated primary antibodies overnight at 4 °C and with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) for 2 hours at room temperature. Nitrocellulose membranes were then washed with TBS-T and analyzed with enhanced ECL detection system (GE Healthcare).

Microarray assay, data processing and analysis

Human MDMs were treated with 100 µM Kaempferol during 72 hours. Then, mRNAs were isolated using RNeasy kit (#74104, Quiagen) and gene expression analyses were performed with Agilent® SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray (Agilent Technologies, AMADID 39494) with the following single-color design. RNAs were labeled with Cy3 using the one-color Agilent labeling kit (Low Input Quick Amp Labeling Kit 5190-2306) adapted for small amount of total RNA (100 ng total RNA per reaction). Hybridization were then performed on microarray using 800 ng of linearly amplified cRNA labeled, following the manufacturer protocol (Agilent SureHyb Chamber; 800 ng of labeled extract; duration of hybridization of 17 hours; 40 µL per array; Temperature of 65 °C). After washing in acetonitrile, slides were scanned by using an Agilent G2565 C DNA microarray scanner with defaults parameters (100° PMT, 3 µm resolution, at 20°C in free ozone concentration environment). Microarray images were analyzed by means of Feature Extraction software version (10.7.3.1) from Agilent technologies. Defaults settings were used. Raw data files from Feature Extraction were imported into R with LIMMA (Smyth, 2004, Statistical applications in Genetics and molecular biology, vol 3, N°1, article 3), an R package from the Bioconductor project, and processed as follow: gMedianSignal data were imported, controls probes were systematically removed, and flagged probes (gIsSaturated, gIsFeatpopnOL, gIsFeatNonUnifOL) were set to NA. Inter-array normalization was performed by quantile normalization. To get a single value for each transcript, taking the median of each replicated probes summarized data. Missing values were inferred using KNN algorithm from the package 'impute' from R bioconductor. Normalized data were then analyzed. To assess differentially expressed genes between two groups, we start by fitting a linear model to the data. Then, we used an empirical Bayes method to moderate the standard errors of the estimated log-fold changes. The top-ranked genes were selected with the following criteria: an absolute fold-change > 2 and an adjusted p-value (FDR) < 0.05.

Detection of IL10 cytokine release

Supernatants harvested from hMDMs or PMA-differentiated human THP1 macrophages that were treated (or not) with 100 µM Kaempferol at indicated times, or from PMA-THP1 that were depleted (or not) for P2Y2 were analyzed using ELISA for IL-10 (BD Biosciences, # 550613), according to the manufacturers' instructions.

Quantitative RT-PCR

After treatment, total cell RNA was extracted using NucleoSpin RNA Plus XS, Micro kit for RNA purification with DNA removal column (#740990.250, Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. RNA was submitted to reverse transcription and PCR amplification. Quantifications were performed by real-time PCR on a Light Cycler instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France) or using CFX Maestro (BioRad). Sequences of the oligonucleotides and probes used to quantify P2Y2, NLRP3 and β-actin are given in Table S1. The amplification of human P2Y2 (Catalog #4331182 Assay ID Hs01856611_s1, ThermoFisher Scientific), human β-actin (Catalog #4331182 Assay ID Hs01060665_g1, ThermoFisher Scientific), mouse P2Y2 (Catalog #4331182 Assay ID Mm02619978_s1) and mouse β-actin (Catalog #4331182 Assay ID Mm02619580_g1) was obtained after 5 minutes at 65°C for annealing primer to the template RNA, 10 minutes at 50°C of reverse transcription, 3 minutes at 95°C of denaturation and 44 cycles with the following step (95°C during 15 seconds and 58°C for 30 seconds). The amplification of human NLRP3 (Catalog #4331182 Assay ID Hs00918082_m1, ThermoFisher Scientific) and murine NLRP3 (Catalog #4331182 Assay ID Mm00840904_m1, ThermoFisher Scientific) was obtained after 5 minutes at 65°C for annealing primer to the template RNA, 10 minutes at 50°C of reverse transcription, 10 minutes at 95°C of denaturation and 44 cycles with the following steps (95°C for 15 seconds and 60°C for 1 min). Cq results were normalized by β-actin mRNA expression levels and reported to control condition. Data are presented as fold changes (FC) and were calculated with relative quantification of ▪CT obtained from quantitative RT-PCR (2^{-DDCt} method).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.1 (GraphPad). Statistical tests and calculated *p* values (**p*< 0.05, ***p* < 0.01, ****p*< 0.001, and *****p*< 0.0001) are indicated in each figure and corresponding figure legend.

References

1. Baumann M, Krause M, Overgaard J, Debus J, Bentzen SM, Daartz J, et al. Radiation oncology in the era of precision medicine. Nat Rev Cancer. 2016;16(4):234-49.

2. Tanaka N, Ishihara M, Kitagawa M, Harada H, Kimura T, Matsuyama T, et al. Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. Cell. 1994;77(6):829-39.

3. Daido S, Yamamoto A, Fujiwara K, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y. Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. Cancer Res. 2005;65(10):4368-75.

4. Huang Z, Epperly M, Watkins SC, Greenberger JS, Kagan VE, Bayir H. Necrostatin-1 rescues mice from lethal irradiation. Biochim Biophys Acta. 2016;1862(4):850-6.

5. Adjemian S, Oltean T, Martens S, Wiernicki B, Goossens V, Vanden Berghe T, et al. Ionizing radiation results in a mixture of cellular outcomes including mitotic catastrophe, senescence, methuosis, and iron-dependent cell death. Cell Death Dis. 2020;11(11):1003.

6. Martins I, Raza SQ, Voisin L, Dakhli H, Allouch A, Law F, et al. Anticancer chemotherapy and radiotherapy trigger both non-cell-autonomous and cell-autonomous death. Cell Death Dis. 2018;9(7):716.

7. Ye LF, Chaudhary KR, Zandkarimi F, Harken AD, Kinslow CJ, Upadhyayula PS, et al. Radiation-Induced Lipid Peroxidation Triggers Ferroptosis and Synergizes with Ferroptosis Inducers. ACS Chem Biol. 2020;15(2):469-84.

8. Ianzini F, Mackey MA. Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. Int J Radiat Biol. 1997;72(4):409-21.

9. Jones KR, Elmore LW, Jackson-Cook C, Demasters G, Povirk LF, Holt SE, et al. p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. Int J Radiat Biol. 2005;81(6):445-58.

10. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Martins I, Kroemer G, et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. Cancer Res. 2010;70(3):855-8.

11. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature. 2002;418(6894):191-5.

12. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. Immunol Rev. 2007;220:47-59.

13. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. Immunity. 2014;41(5):843-52.

14. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type i interferon-dependent innate and adaptive immunity. Cancer Res. 2011;71(7):2488-96.

15. Wu Q, Allouch A, Martins I, Brenner C, Modjtahedi N, Deutsch E, et al. Modulating Both Tumor Cell Death and Innate Immunity Is Essential for Improving Radiation Therapy Effectiveness. Front Immunol. 2017;8:613.

16. Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. Nat Rev Cancer. 2015;15(7):409-25.

17. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol. 2010;11(10):889-96.

18. Feng M, Jiang W, Kim BYS, Zhang CC, Fu YX, Weissman IL. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2019;19(10):568-86.

19. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. Nat Rev Clin Oncol. 2017;14(7):399-416.

20. Advani R, Flinn I, Popplewell L, Forero A, Bartlett NL, Ghosh N, et al. CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma. N Engl J Med. 2018;379(18):1711-21.

21. Kaneda MM, Cappello P, Nguyen AV, Ralainirina N, Hardamon CR, Foubert P, et al. Macrophage PI3Kgamma Drives Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression. Cancer Discov. 2016;6(8):870-85.

22. Zhang P, Miska J, Lee-Chang C, Rashidi A, Panek WK, An S, et al. Therapeutic targeting of tumor-associated myeloid cells synergizes with radiation therapy for glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(47):23714-23.

23. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, et al. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. Cancer Cell. 2013;24(5):589-602.

24. Wu Q, Allouch A, Paoletti A, Leteur C, Mirjolet C, Martins I, et al. NOX2-dependent ATM kinase activation dictates pro-inflammatory macrophage phenotype and improves effectiveness to radiation therapy. Cell Death Differ. 2017;24(9):1632-44.

25. Huang RX, Zhou PK. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. Signal Transduct Target Ther. 2020;5(1):60.

26. Yamazaki T, Kirchmair A, Sato A, Buque A, Rybstein M, Petroni G, et al. Mitochondrial DNA drives abscopal responses to radiation that are inhibited by autophagy. Nat Immunol. 2020;21(10):1160-71.

27. Oliveira M, Rodrigues DR, Guillory V, Kut E, Giotis ES, Skinner MA, et al. Chicken cGAS Senses Fowlpox Virus Infection and Regulates Macrophage Effector Functions. Front Immunol. 2020;11:613079.

28. Vanpouille-Box C, Formenti SC, Demaria S. TREX1 dictates the immune fate of irradiated cancer cells. Oncoimmunology. 2017;6(9):e1339857.

29. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. Nat Commun. 2017;8:15618.

30. Yang H, Wang H, Ren J, Chen Q, Chen ZJ. cGAS is essential for cellular senescence. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(23):E4612-E20.

31. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. Nat Immunol. 2011;12(3):231-8.

32. Bailey JD, Diotallevi M, Nicol T, McNeill E, Shaw A, Chuaiphichai S, et al. Nitric Oxide Modulates Metabolic Remodeling in Inflammatory Macrophages through TCA Cycle Regulation and Itaconate Accumulation. Cell Rep. 2019;28(1):218-30 e7.

33. Gao Z, Li Y, Wang F, Huang T, Fan K, Zhang Y, et al. Mitochondrial dynamics controls anti-tumour innate immunity by regulating CHIP-IRF1 axis stability. Nat Commun. 2017;8(1):1805.

34. Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, Tieu Q, et al. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. Nat Cell Biol. 1999;1(5):298-304.

35. Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. Ann N Y Acad Sci. 2010;1201:34-9.

36. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. Nat Immunol. 2011;12(3):222-30.

37. Ye Z, Shi Y, Lees-Miller SP, Tainer JA. Function and Molecular Mechanism of the DNA Damage Response in Immunity and Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2021;12:797880.

38. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. Science. 2006;314(5806):1792-5.

39. Seye CI, Agca Y, Agca C, Derbigny W. P2Y2 receptor-mediated lymphotoxin-alpha secretion regulates intercellular cell adhesion molecule-1 expression in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 2012;287(13):10535-43.

40. Jeong JY, Kim J, Kim B, Kim J, Shin Y, Kim J, et al. IL-1ra Secreted by ATP-Induced P2Y2 Negatively Regulates MUC5AC Overproduction via PLCbeta3 during Airway Inflammation. Mediators Inflamm. 2016;2016:7984853.

41. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. Immunity. 2014;41(1):14-20.

42. Paoletti A, Allouch A, Caillet M, Saidi H, Subra F, Nardacci R, et al. HIV-1 Envelope Overcomes NLRP3-Mediated Inhibition of F-Actin Polymerization for Viral Entry. Cell Rep. 2019;28(13):3381-94 e7.

43. Lécuyer D, Nardacci R, Tannous D, Gutierrez-Mateyron E, Deva-Nathan A, Subra F, et al. The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection. bioRxiv. 2023.

44. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nat Rev Immunol. 2019;19(8):477-89.

45. Cao DJ, Schiattarella GG, Villalobos E, Jiang N, May HI, Li T, et al. Cytosolic DNA Sensing Promotes Macrophage Transformation and Governs Myocardial Ischemic Injury. Circulation. 2018;137(24):2613-34.

46. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science. 2013;339(6121):786-91.

47. Kapetanovic R, Afroz SF, Ramnath D, Lawrence GM, Okada T, Curson JE, et al. Lipopolysaccharide promotes Drp1-dependent mitochondrial fission and associated inflammatory responses in macrophages. Immunol Cell Biol. 2020;98(7):528-39.

48. Zaja I, Bai X, Liu Y, Kikuchi C, Dosenovic S, Yan Y, et al. Cdk1, PKCdelta and calcineurin-mediated Drp1 pathway contributes to mitochondrial fission-induced cardiomyocyte death. Biochem Biophys Res Commun. 2014;453(4):710-21.

49. Xie Q, Wu Q, Horbinski CM, Flavahan WA, Yang K, Zhou W, et al. Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells. Nat Neurosci. 2015;18(4):501-10.

50. Xu S, Wang P, Zhang H, Gong G, Gutierrez Cortes N, Zhu W, et al. CaMKII induces permeability transition through Drp1 phosphorylation during chronic beta-AR stimulation. Nat Commun. 2016;7:13189.

51. Kashatus JA, Nascimento A, Myers LJ, Sher A, Byrne FL, Hoehn KL, et al. Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. Mol Cell. 2015;57(3):537-51.

52. Han H, Tan J, Wang R, Wan H, He Y, Yan X, et al. PINK1 phosphorylates Drp1(S616) to regulate mitophagy-independent mitochondrial dynamics. EMBO Rep. 2020;21(8):e48686.

53. Shen X, Sun C, Cheng Y, Ma D, Sun Y, Lin Y, et al. cGAS Mediates Inflammation by Polarizing Macrophages to M1 Phenotype via the mTORC1 Pathway. J Immunol. 2023;210(8):1098-107.

54. Wang Q, Bergholz JS, Ding L, Lin Z, Kabraji SK, Hughes ME, et al. STING agonism reprograms tumor-associated macrophages and overcomes resistance to PARP inhibition in BRCA1-deficient models of breast cancer. Nat Commun. 2022;13(1):3022.

55. Li X, Shu C, Yi G, Chaton CT, Shelton CL, Diao J, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization. Immunity. 2013;39(6):1019-31.

56. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. Science. 2013;339(6121):826-30.

57. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. Nature. 2008;455(7213):674-8.

58. Hartlova A, Erttmann SF, Raffi FA, Schmalz AM, Resch U, Anugula S, et al. DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. Immunity. 2015;42(2):332-43.

59. Sarode P, Zheng X, Giotopoulou GA, Weigert A, Kuenne C, Gunther S, et al. Reprogramming of tumor-associated macrophages by targeting beta-catenin/FOSL2/ARID5A signaling: A potential treatment of lung cancer. Sci Adv. 2020;6(23):eaaz6105.

60. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, et al. PI3Kgamma is a molecular switch that controls immune suppression. Nature. 2016;539(7629):437-42.

61. Pello OM, Chevre R, Laoui D, De Juan A, Lolo F, Andres-Manzano MJ, et al. In vivo inhibition of c-MYC in myeloid cells impairs tumor-associated macrophage maturation and pro-tumoral activities. PLoS One. 2012;7(9):e45399.

62. Zhang JL, Liu Y, Yang H, Zhang HQ, Tian XX, Fang WG. ATP-P2Y2-beta-catenin axis promotes cell invasion in breast cancer cells. Cancer Sci. 2017;108(7):1318-27.

63. Hu LP, Zhang XX, Jiang SH, Tao LY, Li Q, Zhu LL, et al. Targeting Purinergic Receptor P2Y2 Prevents the Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Inhibiting Cancer Cell Glycolysis. Clin Cancer Res. 2019;25(4):1318-30.

64. Katz S, Ayala V, Santillan G, Boland R. Activation of the PI3K/Akt signaling pathway through P2Y(2) receptors by extracellular ATP is involved in osteoblastic cell proliferation. Arch Biochem Biophys. 2011;513(2):144-52.

65. Zhou Q, Liu S, Kou Y, Yang P, Liu H, Hasegawa T, et al. ATP Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Invasion and Migration by Activating the PI3K/AKT Pathway via the P2Y2-Src-EGFR Axis. ACS Omega. 2022;7(44):39760-71.

66. Liu Y, Gao X, Miao Y, Wang Y, Wang H, Cheng Z, et al. NLRP3 regulates macrophage M2 polarization through up-regulation of IL-4 in asthma. Biochem J. 2018;475(12):1995-2008.

67. Mehta AK, Cheney EM, Hartl CA, Pantelidou C, Oliwa M, Castrillon JA, et al. Targeting immunosuppressive macrophages overcomes PARP inhibitor resistance in BRCA1-associated triple-negative breast cancer. Nat Cancer. 2021;2(1):66-82.

68. Zhang F, Parayath NN, Ene CI, Stephan SB, Koehne AL, Coon ME, et al. Genetic programming of macrophages to perform anti-tumor functions using targeted mRNA nanocarriers. Nat Commun. 2019;10(1):3974.

69. Allouch A, Voisin L, Zhang Y, Raza SQ, Lecluse Y, Calvo J, et al. CDKN1A is a target for phagocytosis-mediated cellular immunotherapy in acute leukemia. Nat Commun. 2022;13(1):6739.

70. Allouch A, Di Primio C, Paoletti A, Le-Bury G, Subra F, Quercioli V, et al. SUGT1 controls susceptibility to HIV-1 infection by stabilizing microtubule plus-ends. Cell Death Differ. 2020;27(12):3243-57.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the Imaging and Cytometry Platform (Y. Lecluse, S. Salome-Desnoulez and Tudor Manoliu), IMS 3655 CNRS / US 23 INSERM (Gustave Roussy Cancer Campus Villejuif, France) and Bioinformatics core facility (Guillaume Meurice) from Gustave Roussy research platforms for their technical support.

Conflict of interest statement

Jean-Luc Perfettini is founding member of Findimmune SAS, an Immuno-Oncology Biotech company. Jean-Luc Perfettini disclosed research funding not related to this work from NH TherAguix and Wonna Therapeutics.

Author contribution statement

Jean-Luc Perfettini provided financial support. Jean-Luc Perfettini designed and conducted the study. Aurélia Deva Nathan, Ali Mostefa-Kara, Audrey Paoletti, Anais Chapel, Emie Gutierrez-Mateyron, Thanh Trang Cao-Pham, Awatef Allouch performed experiments. Aurélia Deva Nathan, Ali Mostefa-Kara, Audrey Paoletti, Anais Chapel, Emie Gutierrez-Mateyron, Thanh Trang Cao-Pham, Awatef Allouch and Jean-Luc Perfettini analyzed the results. Aurélia Deva Nathan, Ali Mostefa-Kara, Audrey Paoletti and Anais Chapel, performed statistic analysis. Aurélia Deva Nathan, Ali Mostefa-Kara, Audrey Paoletti, Anais Chapel, Emie Gutierrez-Mateyron and Awatef Allouch assembled the figures. Aurélia Deva Nathan, Ali Mostefa-Kara, Awatef Allouch and Jean-Luc Perfettini wrote the initial draft. Audrey Paoletti, Anais Chapel, Emie Gutierrez-Mateyron and Thanh Trang Cao-Pham provided advice and edited the initial draft. All authors read and approved the final version.

Funding statement

This work was supported by funds from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-IBHU-0001, ANR-10-LABX33, ANR-11-IDEX-003-01 and ANR Flash COVID-19 "MacCOV"), Fondation de France (alliance "tous unis contre le virus"), Electricité de France, Fondation Gustave Roussy, Institut National du Cancer (INCa 9414 and INCa 16087), The SIRIC Stratified Oncology Cell DNA Repair and Tumor Immune Elimination (SOCRATE), Fédération Hopitalo-Universitaire (FHU) CARE (Cancer and Autoimmunity Relationships) (directed by X. Mariette, Hôpital Bicêtre, AP-HP) and Université Paris-Saclay. We thank the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM, Paris, France) "One Health" and "Immunothérapies, auto-immunité et Cancer" (ITAC) for its support. Audrey Paoletti, Aurélia Deva Nathan and Emie Gutierrez-Mateyron are recipient of PhD fellowships from French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. Ali Mostefa-Kara is recipient of PhD fellowship from Ecole et Loisir.

Data availability statement

The data analyzed in this study are included in this published article and the supplemental data files. The western blot data are provided in Supplementary Materials (Original western blots).

Figure legends

Figure 1. Ionizing radiation induces cytoplasmic accumulation of DNA breaks and cGAS expression during proinflammatory activation of macrophages. (**A**, **B**) Confocal microscopy images (**A**) and percentages (**B**) of PMA-differentiated human THP1 macrophages showing cytoplasmic double strand (ds) DNA^+ foci 30 minutes after treatment with control or 2 Gy single-dose ionizing radiation (IR) are shown. Nuclei are stained with Hoechst 33342 (scale bar, 3 µm). (**C**, **D**) Confocal microscopy images (**C**) and percentages (**D**) of PMA-differentiated human THP1 macrophages showing cytoplasmic single strand (ss) DNA^+ foci 30 minutes after treatment with control or 2 Gy single-dose IR are shown. Nuclei are stained with Hoechst 33342 (scale bar, 3 µm). (**E**) cGAS expression level detected 3 hours after the treatment of murine RAW264.7 macrophages with control or 2 Gy single-dose IR. Representative western blots are shown. β-actin is used as loading control. (**F**) cGAS expression level detected 6 hours after the treatment of PMA-differentiated human THP1 macrophages with control or 2 Gy single-dose IR. Representative western blot is shown. GAPDH is used as loading control. (G, H) Confocal microscopy images (**G**) and percentages (**H**) of PMA-differentiated human THP1 macrophages expressing iNOS ($iNOS^+$) 24 hours after treatment with control or 2 Gy single-dose IR. Nuclei are stained with Hoechst 33342 (scale bar, 5 µm). (**I**) IRF5 expression level detected after 96 hours of treatment of PMA-differentiated human THP1 macrophages with control or 2 Gy single-dose IR. Representative western blots are shown. GAPDH is used as loading control. (**J**) IRF5 expression level detected after 6 hours of treatment of murine RAW264.7 macrophages with control or 2 Gy single-dose IR. Representative western blots are shown. β-actin is used as loading control. Images are representative from 3 independent experiments. Data are means ± S.E.M from three independent experiments. P-values (**P< 0.01) determined with two-tailed unpaired t-test (**B**, **D**, **H**).

Figure 2. DRP1-dependent mitochondrial fragmentation and cGAS dictates IR-mediated proinflammatory activation of macrophages. (**A**, **B**) 3D reconstructions of confocal microscopy images of the mitochondrial networks (**A**) and percentages (**B**) of PMA-differentiated human THP1 macrophages showing mitochondrial fragmentation 30 minutes after the treatment with control or 2 Gy single-dose IR are shown. Mitochondria networks are revealed by TOM 20 expression (scale bar, 3 µm). Magnifications are shown (scale bar, 1 µm). Images are representative from 3 independent experiments. (**C**, **D**) DRP1S616* expression level detected 6 hours after the treatment of murine RAW264.7 macrophages (**C**) or PMA-differentiated human THP1 macrophages (**D**) with control or 2 Gy single-dose IR. Representative western blots are shown. β-actin is used as loading control. (**E**) 3D reconstructions of confocal microscopy images of the mitochondrial networks of PMA-differentiated human THP1 macrophages detected 30 minutes after the treatment with 10 µM Mdivi-1 with control or 2 Gy single-dose IR are shown. Mitochondria networks are detected as shown in (**A**) (scale bar, 3 µm). Images are representative from 3 independent experiments. (**F**) Higher magnification details of the mitochondrial networks detected in 2 Gy-irradiated PMA-differentiated human THP1 macrophages or in PMA-

differentiated human THP1 macrophages that were treated with Mdivi-1 and irradiated with a single dose of 2 Gy. Images are representative from 3 independent experiments (scale bar, 1 µm). (**G**) Percentages of PMA-differentiated human THP1 macrophages showing fragmented mitochondria 30 minutes after the treatment with control, 2 Gy single-dose IR, 10 µM Mdivi-1, or 2 Gy single-dose IR combined with 10 µM Mdivi-1 are shown. (**H**) cGAS and DRP1 expressions after 6 hours of culture of PMA-differentiated human THP1 macrophages depleted or not for DRP1, and irradiated (or not) with a single dose of 2 Gy. Representative westerns are shown. GAPDH is used as loading control. (**I**, **J**) Confocal microscopy images (**I**) and percentages (**J**) of PMA-differentiated human THP1 macrophages showing iNOS and γ-H2AX expressions 24 hours after treatment with control, 2 Gy single-dose IR, 5 µM G-140, or 2 Gy single-dose IR combined with 5 µM G-140 are shown. Nuclei are stained with Hoechst 33342 (scale bar, 5 µm). Images are representative from 3 independent experiments. (**K**) IFR5 expression after 96 hours of culture of PMA-differentiated human THP1 macrophages that have been treated with control, 2 Gy single-dose IR, 5 µM G-140, or 2 Gy single-dose IR combined with 5 µM G-140. Representative western blots are shown. GAPDH is used as loading control. (**L**) IFR5 expression after 6 hours of culture of murine RAW264.7 macrophages that have been treated with control, 2 Gy single-dose IR, 10 µM RU521, or 2 Gy single-dose IR combined with 10 µM RU521. Representative western blots are shown. GAPDH is used as loading control. (**M**) IRF5 expression after 96 hours of culture of PMA-differentiated human THP1 macrophages depleted or not for cGAS and treated with control or 2 Gy single-dose irradiation. Representative western blots are shown. GAPDH is used as loading control. Data are means ± S.E.M from three independent experiments. P-values (*P< 0.05, **P< 0.01 and ***P< 0.001) were determined with two-tailed unpaired t-test (**B**) or two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (**G**, **J**).

Figure 3. Purinergic receptor P2Y2 represses proinflammatory macrophage activation. (**A**-**N**) hMDMs (**A**, **B**, **H**, **J**, **K**, **M**), PMA-differenciated human THP1 macrophages (**C**, **F**, **G**, **I**, **L**, **N**) or murine RAW264.7 macrophages (**D**, **E**) treated with kaempferol (Kaempf.) (**A**-**C**, **J**-**M**), IFNγ (**B**), ARC-118925XX (ARC) (**C**), transfected with siRNA (**D**-**H**) or expressing shRNA (**I**, **N**) were analyzed for gene expression of known human polarization-specific markers (**A**), IRF5 (**B**, **C**, **E**, **G**-**I**), P2Y2 (**D**, **F**, **H**, **I**), membrane CD163 (**J**, **K**) and IL-10 (**L**-**N**) expressions. Results were obtained from at least 3 independent experiments. P-values (*P< 0.05, **P< 0.01) were calculated by using one sample Wilcoxon test (**D**, **F**), Wilcoxon matched-paired signed rank test (**K**), two-tailed unpaired t-test (**L**, **N**) and two-tailed Mann-Whitney test (**M**).

Figure 4. Purinergic receptor P2Y2 negatively regulated NLRP3 transcription. (**A**-**G**) Murine RAW264.7 macrophages (**A**, **D**) and PMA-THP-1 macrophages (**B**, **C**, **E**, **F**) transfected with siRNA (**A**, **B**, **D**, **E**) or expressing shRNA (**C**, **F**) for murine (**A**, **D**) or human (**B**, **C**, **E**, **F**) P2Y2 were analyzed for NLRP3 protein (**A**-**C**) or mRNA expression levels (**D**-**F**). β-actin is used as loading control in (**A**-**C**). (**G**) PMA-THP-1 macrophages were transfected with control siRNA, siRNA for P2Y2, siRNA for NLRP3 or for both siRNA P2Y2 and NLRP3 and were analyzed for P2Y2, NLRP3

and IRF5 protein expressions. β-actin is used as loading control. Results were obtained from at least 3 independent experiments. P-values (*P< 0.05 and **P< 0.01) were determined with one sample Wilcoxon test (**D**, **E**, **F**).

Figure 5. P2Y2 depletion enhances IR-mediated proinflammatory macrophage activation. (**A-F**) Confocal microscopy images (**A**, **C**, **E**) and percentages of PMA-differentiated, control or P2Y2-depleted human THP1 macrophages showing cytoplasmic dsDNA$^+$ foci (**A**, **B**), ssDNA$^+$ foci (**C**, **D**) or fragmented mitochondria (**E**, **F**) 30 minutes after treatment with control or 2 Gy single-dose ionizing radiation (IR) are shown. Nuclei are stained with Hoechst 33342 (scale bar, 3 µm). (**G**, **H**) Confocal microscopy images (**G**) and percentages (**H**) of PMA-differentiated, control or P2Y2-depleted human THP1 macrophages expressing (or not) iNOS (iNOS$^+$) macrophages THP1 after 24 hour treatment with control or 2 Gy single-dose IR are shown. Nuclei are stained with Hoechst 33342 (scale bar, 5 µm). P-values (*P< 0.05, **P< 0.01 and ****P< 0.0001) were calculated by using two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test (**B**, **D**, **F**, **H**).

Supplemental materials

Supplemental Figures 1-4.

Supplemental Figure 1. PMA-THP1 macrophages exhibited γ-H2AX$^+$ foci after 2-Gy irradiation. (**A**) Percentages of PMA-differentiated human THP1 macrophages showing γ-H2AX$^+$ nuclear foci 1 hour after treatment with control or 2 Gy single-dose IR (scale bar, 5 µm).

Supplemental Figure 2. cGAS and IRF5 protein expression levels are increased in IFN-γ treated PMA-THP1 macrophages. (**A**, **B**) cGAS (A) and IRF5 (**B**) protein expression levels detected 72 hours after the treatment of PMA-differentiated human THP1 macrophages with control or 100 ng/ml IFN-γ. Representative western blo3ts are shown. β-actin is used as loading control.

Supplemental Figure 3. Validation of cGAS depletion. (**A**) PMA-differentiated human THP1 macrophages depleted for cGAS (siRNA cGAS) were analyzed for cGAS expression.

Supplemental Figure 4. Kaempferol reduces membrane expression of CD206. (**A**, **B**) hMDMs treated with kaempferol (Kaempf.) were analyzed for membrane CD206 expression. Representative flow cytometry analysis (**A**) and quantifications (**B**) are shown. Results were obtained form at least 3 independent experiments. P-value (*P< 0.05,) was calculated by using Wilcoxon test (B).

Supplemental Tables S1 and S2.

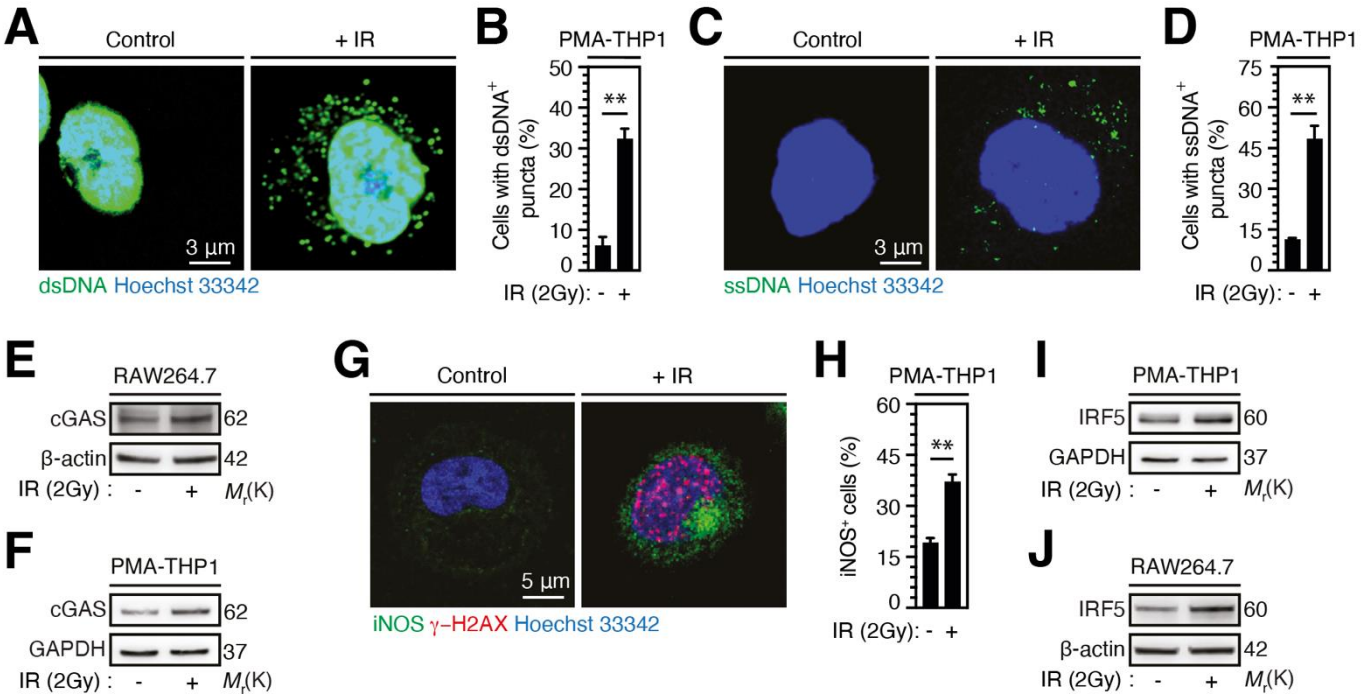
Table S1. Human siRNA, siGENOME SMARTpool, siON-TARGETplus SMARTpool and shRNA used in this study.

Human Target	sg	Target sequence	Reference
siGENOME Non Targeting SMARTpool	1 2 3 4	UAGCGACUAAACACAUCAA UAAGGCUAUGAAGAGAUAC AUGUAUUGGCCUGUAUUAG AUGAACGUGAAUUGCUCAA	Dharmacon D-001206-14-05
siGENOME SMARTpool MB21D1	1 2 3 4	GAAGAAACAUGGCGGCUAU GAAGAGAAAUGUUGCAGGA GUAAGGAAUUUCUGACAAA CAACACUCGUGCAUAUUAC	Dharmacon M-015607-01-0005
siON-TARGET plus Non Targeting SMARTpool	1 2 3 4	UGGUUUACAUGUCGACUAA UGGUUUACAUGUUGUGUGA UGGUUUACAUGUUUUCUGA UGGUUUACAUGUUUUCCUA	Dharmacon D001810-10-05
siON-TARGET plus SMARTpool DNM1L	1 2 3 4	GGAGCCAGCUAGAUAUUAA CAUCAGAGAUUGUUUACCA CGUAAAAGGUUGCCUGUUA GUGAACCCGUGGAUGAUAA	Dharmacon L-012092-00-0005
siON-TARGET plus SMARTpool P2Y2 (siP2Y2.3)	1 2 3 4	CGAGAACACUAAGGACAUU CGACAGAACUGACAUGCAG GGAAUGCGUCCACCACAUA UGCCGCUGCUGGUCUAUUA	Dharmacon L-003688-00-0005

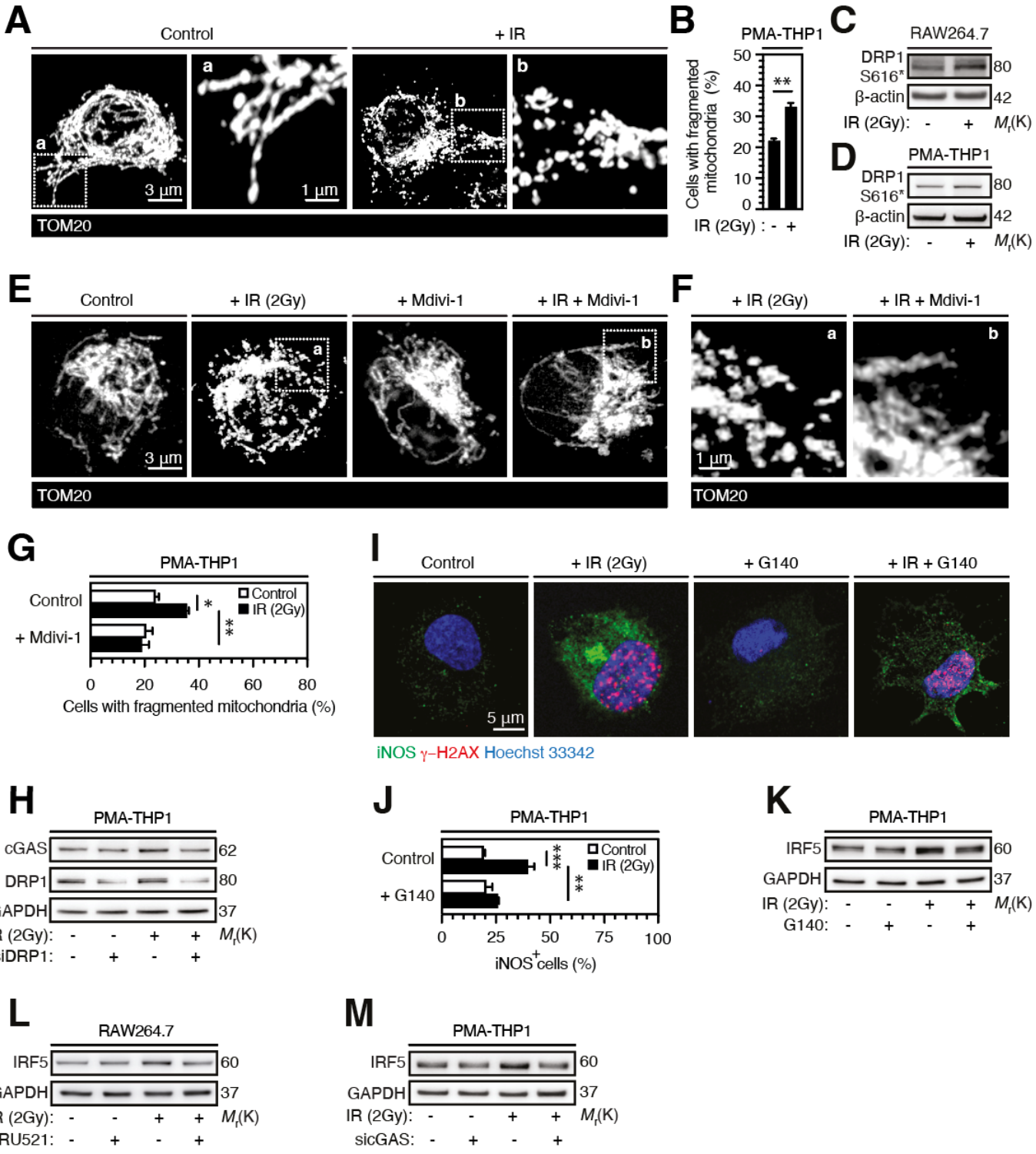
Human Target	sg	Target sequence	Reference
siControl	1	UUCAAUAAAUUCUUGAGGU	Sigma
siP2Y2.1	1	GGAUAGAAGAUGUGUUGGG	Sigma
siP2Y2.2	2	GGCUGUAACUUAUACUAAA	Sigma
siNLRP3.1	1	GGAUCAAACUACUCUGUGA	Sigma
siNLRP3.2	2	UGCAAGAUCUCUCAGCAAA	Sigma
pLKO 1.shP2Y2	1	ATGTTCCACCTGGCTGTGTCTGATGCACT	Sigma

Table S2. Mouse siRNA used in this study

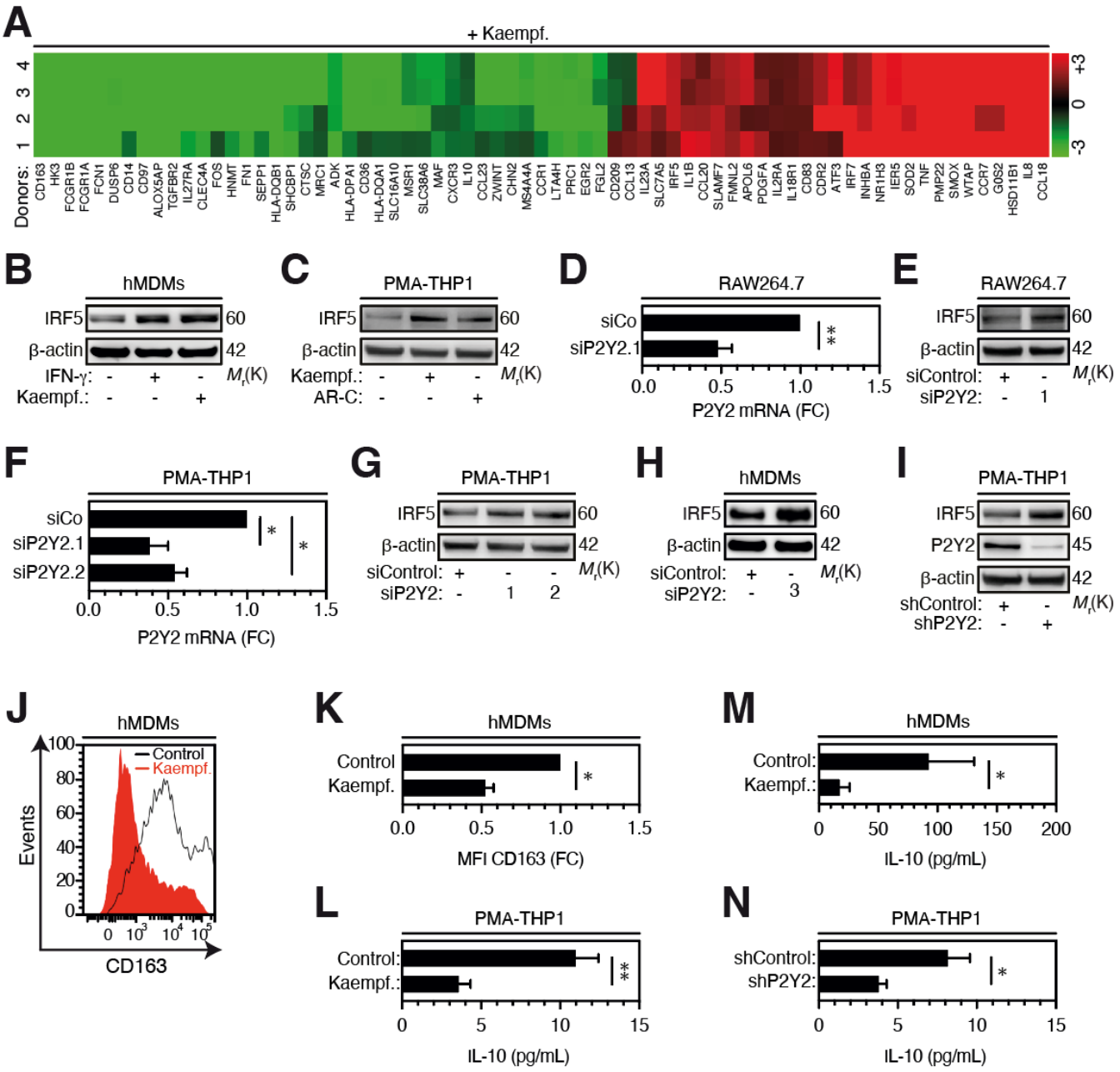
Mouse Target	sg	Target sequence	Reference
siControl	1	UUCAAUAAAUUCUUGAGGU	Sigma
siP2Y2.1	1	CUAAGGACAUUCGGCUAUA	Sigma



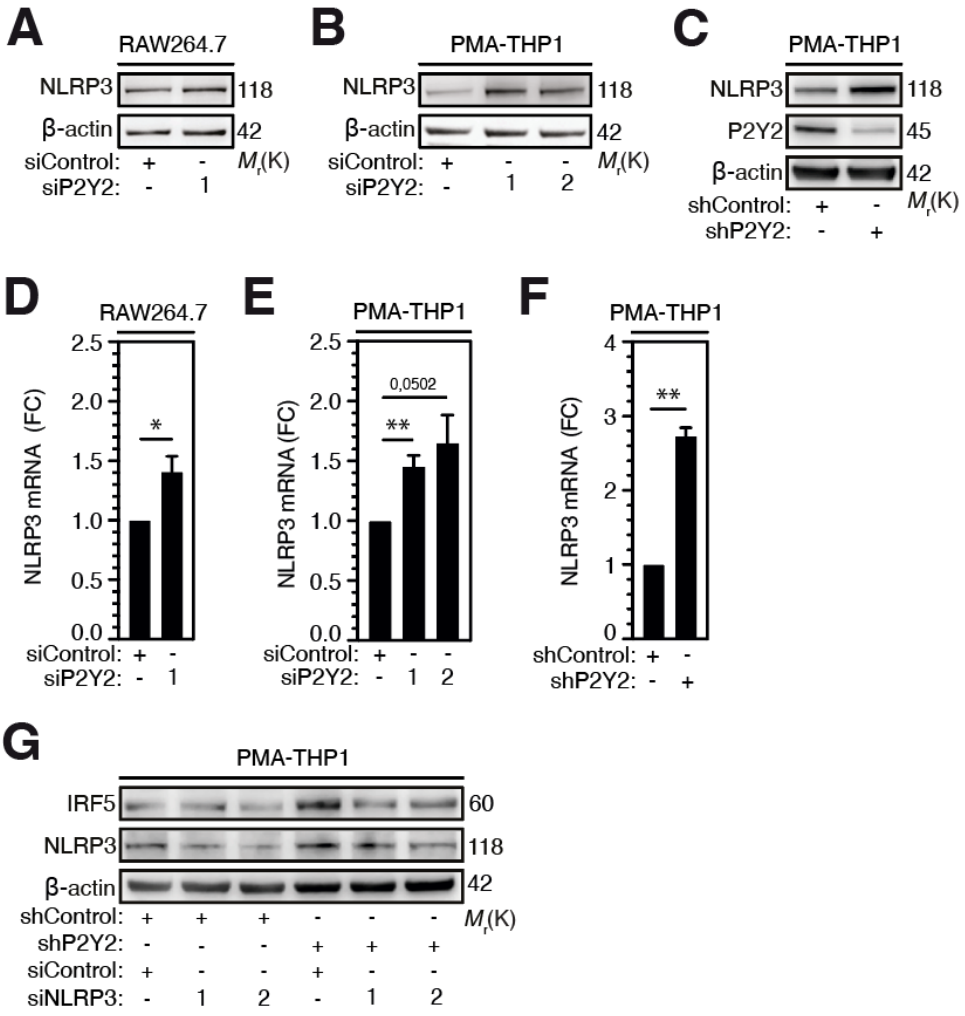
DEVA NATHAN#1



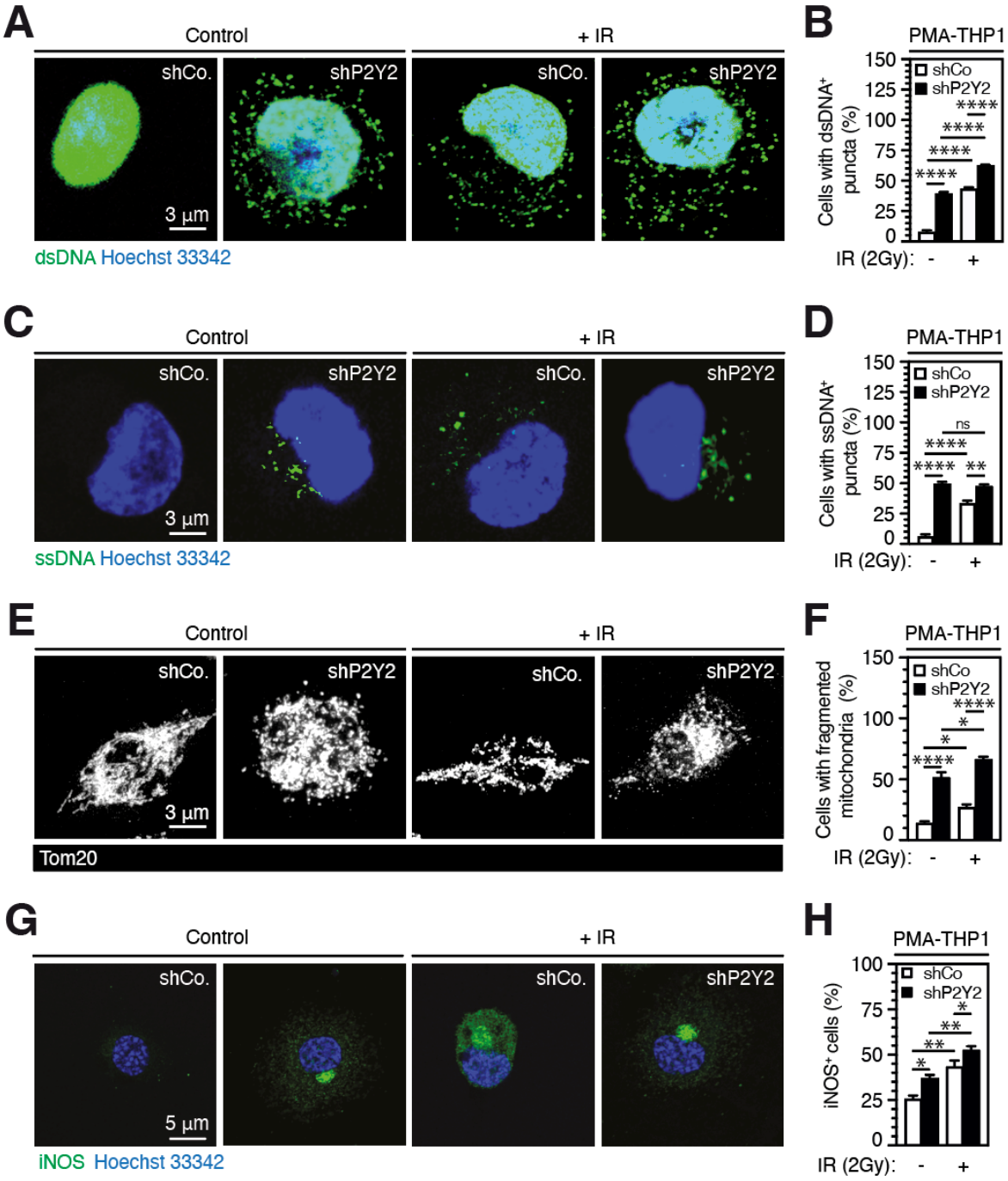
DEVA NATHAN#2



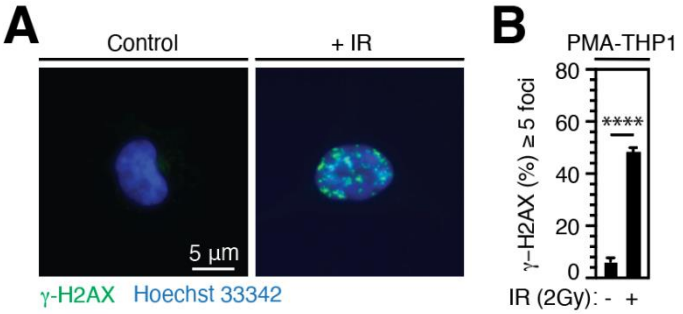
DEVA NATHAN#3



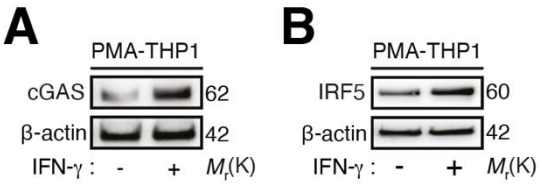
DEVA NATHAN#4



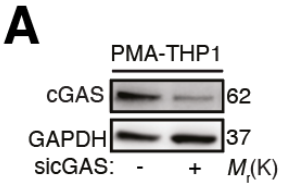
DEVA NATHAN#5



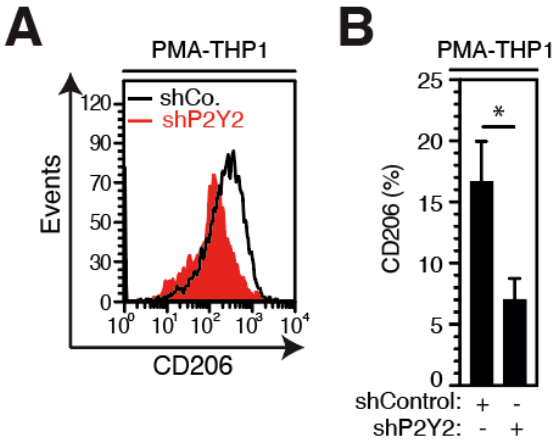
DEVA NATHAN#S1



DEVA NATHAN#S2



DEVA NATHAN#S3



DEVA NATHAN#S4

DISCUSSION

Les macrophages constituent la première ligne de défense du système immunitaire innée contre les agressions extérieures et sont caractérisés par de nombreuses activités biologiques, allant de l'élimination des pathogènes, l'orchestration des processus inflammatoires, l'activation de la réponse immunitaire adaptative jusqu'à la réparation tissulaire. Cette ambivalence fonctionnelle est due à la capacité des macrophages à adapter ses fonctions aux signaux émis par son microenvironnement. L'activation des macrophages participe également à la pathogenèse de nombreuses maladies. Leur reprogrammation fonctionnelle d'un phénotype pathologique vers un phénotype protecteur constitue donc une stratégie thérapeutique prometteuse dans plusieurs contextes pathologiques. En particulier, dans le cancer, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont présents de manière abondante au sein de microenvironnement tumoral (TME) et présentent un phénotype majoritairement immunosuppresseur et pro-tumoral. La reprogrammation fonctionnelle de ces macrophages vers un phénotype aux fonctions anti-tumorales représente une voie thérapeutique prometteuse.

Depuis sa découverte, la radiothérapie (RT) occupe une place centrale dans les stratégies thérapeutiques anti-tumorales. Au-delà d'induire directement la mort cellulaire et la sénescence, il a été démontré que la RT favorise également les réponses immunitaires anti-tumorales, telles que l'induction de la mort cellulaire immunogène, l'amplification de la présentation de l'antigène tumoral et l'activation des cellules T, ainsi que la stimulation d'un effet abscopal. En 2011, Klug et *al.* ont mis en lumière la capacité de la RT à déclencher la reprogrammation fonctionnelle des TAMs immunosuppresseurs vers un phénotype pro-inflammatoire anti-tumoral. A la suite de ces travaux, notre équipe a révélé la capacité des rayonnements ionisants (RI) à déclencher directement au niveau des macrophages un processus d'activation pro-inflammatoire, qui implique la NADPH oxydase 2 (NOX2), la kinase ATM et le facteur de transcription IRF5. La poursuite de la caractérisation des voies de signalisation impliquées dans l'activation pro-inflammatoire des macrophages, déclenchées à la suite des radiations ionisantes représente selon nous une étape indispensable pour stimuler une réponse immunologique anti-tumorale efficace et augmenter l'efficacité anti-tumorale de la radiothérapie.

Au cours de mes travaux de recherche, nous avons mis en avant une voie de signalisation, déclenchée par les rayonnements ionisants au niveau des macrophages et impliquant l'activation du capteur d'ADN cGAS et de la protéine DRP1. De plus, nous avons identifié le récepteur purinergique P2Y2 comme étant un répresseur endogène de l'activation pro-inflammatoire des macrophages. Enfin, nous avons démontré que la combinaison de la RT avec l'inhibition du récepteur P2Y2 pouvait potentialiser les effets de la RT sur l'activation des macrophages.

Dans cette partie, nous allons discuter (i) de la voie de signalisation radio-induite proposée, (ii) du rôle du récepteur P2Y2 dans l'activation des macrophages, ainsi que (iii) du rôle potentiel de la protéine NLRP3 dans ce processus et (iv) de la combinaison des radiations ionisantes avec l'inhibition du récepteur P2Y2.

1. L'activation de la proteine cGAS depend de la proteine DRP1 et declenche la reprogrammation fonctionnelle radio-induite des macrophages.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons détecté l'accumulation de mitochondries fragmentées au niveau des macrophages irradiés, suggérant que la modulation de la dynamique mitochondriale pourrait contribuer à l'activation pro-inflammatoire des macrophages. La fragmentation des mitochondries implique plusieurs protéines mitochondriales spécifiques et notamment l'activation de la protéine de fission DRP1. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de celle-ci au niveau des macrophages fragmentés après irradiation. Une augmentation de la phosphorylation activatrice de la protéine DRP1 (DRP1 S616*), favorisant la fission mitochondriale, a été détectée rapidement après l'irradiation des macrophages. En outre, nos résultats démontrent aussi que l'inhibition de DRP1 diminue la fragmentation mitochondriale, la stabilisation de cGAS ainsi que l'activation pro-inflammatoire des macrophages irradiés. Cela souligne l'implication de la protéine DRP1 dans l'induction de l'activation radio-induite des macrophages. Nos résultats sont semblables avec ceux obtenus par Kobashigawa et *al*. sur un modèle de fibroblastes humains, où les radiations ionisantes induisent une fission mitochondriale dépendante de DRP1 (325).

De plus, nos résultats peuvent également être mis en parallèle avec d'autres études, démontrant l'implication de la phosphorylation de DRP1 S616* dans l'activation des macrophages induite par le LPS (190–193). Ces différentes études ont révélé le rôle de la stimulation de la voie TLR4 (190), ainsi que celui de la phosphorylation du facteur de transcription STAT2 (191) dans l'activation de DRP1 induite par le LPS. Afin de préciser les mécanismes impliquant l'activation de DRP1 à la suite de l'irradiation, il serait intéressant d'évaluer l'implication de TLR4 et STAT2, dans l'activation radio-induite des macrophages. En effet, l'augmentation d'expression de TLR4 médiée par les ROS radio-induits a été décrite au niveau des monocytes humains (580). Par ailleurs, Gao & al. ont établi un lien entre les TLRs, la fission mitochondriale et l'activation des macrophages. Ils ont montré que les agonistes des récepteurs TLRs entraînent la déplétion de la protéine mitochondriale FAM73b, qui induit la fission mitochondriale et stabilise le facteur de transcription IRF1. Au niveau des TAMs, ils ont révélé que l'activation de cette voie entraîne l'induction de la réponse des lymphocytes T, favorisant ainsi une reprogrammation fonctionnelle anti-tumorale de ces TAMs (581). Il serait ainsi intéressant d'étudier si un lien existe entre l'expression de la protéine FAM73b et l'induction de la fission mitochondriale dépendante de DRP1 au niveau des macrophages irradiés. DRP1 étant une protéine cytosolique, le rôle potentiel de la protéine mitochondriale

FAM73b dans la translocation de DRP1 au niveau mitochondrial après irradiation pourrait être questionné.

Nos résultats démontrent également que les radiations ionisantes déclenchent rapidement l'accumulation cytosolique d'ADN simple et double brin au niveau des macrophages irradiés. Avant d'interroger le lien entre cette libération d'ADN cytosolique et la dynamique des mitochondries dépendante de DRP1, la question de l'origine de cet ADN cytosolique doit être abordée en premier lieu : est-ce une origine nucléaire ? mitochondriale ? Selon l'origine, plusieurs mécanismes de libération peuvent être évoqués. D'une part, dans un contexte d'irradiation, la libération d'ADN nucléaire peut par exemple faire suite à la formation et la rupture des micronoyaux, ou encore en cas de rupture de la membrane nucléaire après mort cellulaire. D'autre part, l'irradiation peut également endommager l'ADN mitochondriale notamment par la production de ROS. De plus, le changement de dynamique mitochondriale entre fusion et fission est décrit dans la littérature comme essentiel pour la distribution de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (582,583). Il est probable, que l'accumulation d'ADN cytosolique observée résulte à la fois d'une libération d'ADN mitochondrial et également d'une libération d'ADN nucléaire. Divers mécanismes de libération cytosolique d'ADN et voies de signalisation associées pourraient donc ainsi être impliqués et étudiés.

Dans la littérature, il n'est pas décrit de lien direct entre la libération d'ADN nucléaire et la protéine DRP1 et/ou la dynamique mitochondriale. En revanche, plusieurs études ont démontré que l'induction de la fission mitochondriale est associée à une libération d'ADNmt dans le cytosol (193,584–586). Particulièrement, Cao et *al.*, ont montré qu'une fission mitochondriale importante induit l'expression de la protéine BAX au niveau mitochondrial, qui va alors former un pore, favorisant ainsi la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries (584). De plus, Montessuit et *al.* ont montré que cette oligomérisation de BAX à la membrane mitochondriale induite par la fission mitochondriale pouvait dépendre de la protéine DRP1. La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale représente un des mécanismes induisant la libération d'ADNmt (383). La libération de vésicules mitochondriales (587), l'augmentation du potentiel de la membrane mitochondriale (588) ou encore la perte de certaines protéines mitochondriales compromettant l'intégrité de la membrane des mitochondries (589) peuvent également constituer d'autres moyen de libérer l'ADNmt dans le cytosol.

Nous avons montré, en plus de l'accumulation cytosolique d'ADN simple et double brin, une stabilisation du capteur d'ADN cGAS au niveau des macrophages irradiés, suggérant que la protéine cGAS détecte l'auto-ADN induit par les RI et s'accumule dans le cytosol des macrophages irradiés. Nous avons ensuite révélé que le capteur cGAS ainsi stabilisé induit une augmentation d'expression de l'iNOS et du facteur de transcription IRF5, et favorise l'activation pro-inflammatoire des macrophages irradiés. Nos résultats sont cohérents avec des publications antérieures, révélant que la détection de l'ADN cytosolique par les capteurs cGAS

régit l'activation pro-inflammatoire des macrophages et les lésions ischémiques du myocarde (590). Les mécanismes moléculaires, à l'origine de la régulation positive du niveau d'expression de cGAS en réponse aux RI restent cependant à étudier.

Le lien entre la stabilisation de la protéine cGAS et l'activation pro-inflammatoire des macrophages peut être questionné. Dans ce sens, l'activation de cGAS après la RT est bien décrite dans la littérature. Brièvement, après reconnaissance et liaison à l'ADN cytosolique, la protéine cGAS est activée et produit le second messager cGAMP, qui se lie à la protéine STING et induit sa dimérisation et sa translocation du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, où elle se lie à la kinase TBK1 et l'active. Une fois activée, TBK1 stimule la translocation des facteurs de transcription NF-κB et IRF3 dans le noyau, où ils favorisent l'expression des gènes stimulés par l'interféron et conduisent à la sécrétion d'interféron de type I et des cytokines inflammatoires. Il serait donc intéressant d'étudier, si la stabilisation du capteur d'ADN cGAS que nous observons est associée à l'activation de l'ensemble de cette voie au sein des macrophages irradiés et donc d'étudier l'expression de la protéine STING, la phosphorylation de TBK1, les facteurs de transcription IRF3 et NF-κB ainsi que la sécrétion d'IFN de type I sur ces macrophages. De plus, Wang et *al*. ont récemment établi le lien entre l'activation de STING et la reprogrammation fonctionnelle des TAMs. Ils ont montré que l'activation pharmacologique de STING par ses agonistes permet de reprogrammer les TAMs pro-tumoraux en TAMs anti-tumoraux, dans un modèle murin de cancer du sein déficient pour la protéine BRCA1. Cet effet permet de lever la résistance thérapeutique aux inhibiteurs de PARP induite par les TAMs, ainsi que de potentialiser la réponse anti-tumorale des cellules T (278). D'autres études ont également montré l'intérêt de cibler la protéine STING afin d'induire une reprogrammation pro-inflammatoire des macrophages. Lam et *al*. ont révélé que le microbiote intestinal est capable de déclencher une reprogrammation fonctionnelle des monocytes dans le TME, dépendante de STING et aboutissant à des macrophages anti-tumoraux (591). Gomes et *al*., ont montré que la protéine STING contribue à l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire, lors de l'infection par *Brucella abortus* et de manière dépendante au facteur HIF-1α (592). Enfin, l'activation des macrophages induite par STING via la phosphorylation de TBK1 a été révélé et favorise la production de cytokines pro-inflammatoires, l'associant ainsi à la progression de l'inflammation et la fibrose hépatiques chez les patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (593). Ces études démontrent l'implication de la protéine STING dans l'activation pro-inflammatoire des macrophages et notamment dans l'acquisition d'un phénotype anti-tumoral de la part des macrophages (278,591). L'implication de la protéine STING dans notre voie de signalisation, notamment en aval de la stabilisation de cGAS est donc questionnable. Cependant, la stabilisation de cGAS est également décrite dans la littérature comme indépendante de STING (384). Des travaux supplémentaires permettraient d'établir le lien entre la protéine cGAS et l'activation des macrophages, et d'étudier l'implication de la protéine STING.

Etant donné la capacité de l'ADN cytosolique à être reconnu par d'autres capteurs

cellulaires, l'influence de ces capteurs sur la reprogrammation pro-inflammatoire des macrophages irradiés pourrait être évaluée. Par exemple, les récepteurs TLRs, tels que les TLR3/7/8 et 9 sont des PRRs capables de détecter les acides nucléiques et d'assurer la médiation avec la réponse immunitaire innée. Bao et *al.* ont démontré au sein des cellules de carcinome hépatocellulaire, que l'accumulation cytosolique d'ADN à la suite à la fission mitochondriale, est détectée par le récepteur TLR9. Il s'en suit alors l'activation du facteur de transcription NF-κB (586). Ce dernier est impliqué dans l'activation pro-inflammatoire des macrophages. L'implication de cette voie de signalisation médiée par le récepteur TLR9 dans l'activation pro-inflammatoire des macrophages irradiés pourrait ainsi être étudiée.

Pour conclure, notre étude a permis d'établir un lien entre les radiations ionisantes et la phosphorylation de DRP1 (S616*), la fission/fragmentation mitochondriale, la libération d'ADN cytosolique, la stabilisation de cGAS et l'activation pro-inflammatoire des macrophages.

2. L'INHIBITION DE P2Y2 AUGMENTE LA CAPACITE DES MACROPHAGES A ETRE REPROGRAMMES DE FAÇON PRO-INFLAMMATOIRE.

Lors de mes travaux de thèse, nous avons également démontré que l'inhibition pharmacologique (par le Kaempférol ou l'ARC-119825XX) ou génétique du récepteur purinergique P2Y2 conduit à la réduction de la sécrétion de la cytokine immunosuppressive IL-10, la diminution d'expression membranaire des marqueurs d'activation anti-inflammatoire CD163 et CD206, l'augmentation de l'expression du facteur de transcription IRF5 et l'induction de la majorité des marqueurs humains connus de l'activation des macrophages. L'inhibition de P2Y2 déclenche l'activation pro-inflammatoire des macrophages et permet d'identifier le récepteur purinergique P2Y2 comme un répresseur de cette activation des macrophages. Peu d'études existantes établissent un lien clair entre l'activation des macrophages et le récepteur P2Y2. D'une part, Dybbro et *al.* démontrent l'implication du récepteur purinergique P2Y2 dans l'activation des macrophages induite par la voie NF-κB et dépendante du LPS, sur un modèle de monocytes murins différenciées en macrophages par le M-CSF (539,540). Ces travaux sont ainsi en contradiction avec les nôtres. De la Rosa et *al.* ont également révélé l'implication du récepteur P2Y2 dans la sécrétion d'IL-1β au sein des macrophages péritonéaux murins activés par LPS + ATP (594). Dans le même sens, Eun et *al.* ont montré que le LPS potentialise l'expression des gènes inflammatoires, induits par les nucléotides dans les macrophages murins RAW264.7, par l'expression du récepteur P2Y2 (595), à l'encontre de nos résultats obtenus en transcriptomique après inhibition de P2Y2. Enfin, d'autre part, Merz & *al.* ont étudié l'expression des différents récepteurs purinergiques selon l'état d'activation des macrophages. Ils ont ainsi montré, que lors de l'activation pro-inflammatoire induite par LPS+IFN-γ sur des macrophages murins dérivés de monocytes et différenciés par M-CSF, une diminution d'expression du récepteur purinergique P2Y2 est retrouvée (596). Dans l'ensemble, la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus des différentes études suggère que les modèles cellulaires cultivés *in vitro* (moelle osseuse murine et différenciée en macrophages,

macrophages résidents murins, lignées cellulaires humaines ou murines de macrophages/monocytes) pourraient conditionner les résultats obtenus. De plus, pour chaque étude, différentes stratégies d'activation des macrophages ont été utilisées et peuvent ainsi générer des profils d'activation distincts des macrophages, dans lesquels le récepteur purinergique P2Y2 peut être impliqué de manière différente.

3. L'IMPLICATION DE LA PROTEINE NLRP3 DANS L'ACTIVATION PRO-INFLAMMATOIRE DES MACROPHAGES

La question de la voie de signalisation par laquelle le récepteur P2Y2 module l'activation des macrophages doit également être adressée. Dans ce sens, notre équipe a auparavant démontré l'implication du récepteur purinergique P2Y2 dans la régulation négative de l'inflammasome NLRP3 dans des macrophages infectés par le VIH-1 (597). C'est dans ce contexte que nous avons voulu nous intéresser à l'implication de la protéine NLRP3 dans l'activation des macrophages, observée à la suite de l'inactivation de P2Y2. Nous avons montré, que l'inhibition génétique de P2Y2 induit une augmentation de l'expression de la protéine NLRP3. De manière intéressante, nous avons révélé que P2Y2 régule l'expression de NLRP3 à un niveau transcriptionnel. Par ailleurs, nous avons démontré que l'inhibition génétique de NLRP3 permet de réprimer l'activation pro-inflammatoire des macrophages induite par l'inactivation fonctionnelle de P2Y2, suggérant ainsi que la régulation transcriptionnelle de NLRP3 est nécessaire pour la modulation de l'activation pro-inflammatoire des macrophages dépendante de P2Y2, soulignant ainsi une nouvelle fonction de la protéine NLRP3 au cours de l'activation pro-inflammatoire des macrophages.

La protéine NLRP3 est impliquée dans la formation de l'inflammasome NLRP3, complexe multiprotéique essentiel à la réponse immunitaire innée et se caractérisant par la libération de cytokines pro-inflammatoires (telles que les interleukines IL-1β et IL-18) ou encore par le clivage de la gasdermine-D (GSDM-D) et la translocation de cette dernière au niveau de la membrane plasmique, formant ainsi un pore membranaire. Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer si l'induction de l'expression de la protéine NLRP3 observée après inhibition de P2Y2 est associée ou non à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'expression des constituants de cet inflammasome (la caspase-1 et la protéine ASC) ainsi que ses produits (IL-1β, IL-18 et GSDM-D). Dans ce sens, nos résultats de transcriptomique ont montré que l'inhibition de P2Y2 sur des macrophages humains induit la hausse d'expression de l'ARNm de l'IL-1β. De plus, ces résultats ont été confirmé *in vitro* par notre équipe, au cours d'un projet mené en parallèle, démontrant que les macrophages déplétés pour P2Y2, présentent une sécrétion plus importante d'IL-1β (**Annexe 1**). La poursuite de l'étude de l'inactivation fonctionnelle de P2Y2 sur les autres composants et sécrétions de l'inflammasome NLRP3, nous permettrait de déterminer si l'inhibition de P2Y2, au-delà d'impacter les niveaux transcriptionnels et protéiques de NLRP3, impacte également la formation de l'inflammasome. De plus, la formation de l'inflammasome NLRP3 induit

également une mort cellulaire inflammatoire, appelée pyroptose. Il serait ainsi intéressant de considérer si l'inactivation fonctionnelle de P2Y2 au niveau des macrophages, induit une activation pro-inflammatoire des macrophages transitoire, aboutissant à la mort de ces macrophages.

Quelques études impliquent l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le phénotype pro-tumoral macrophages (598–600). La sécrétion d'IL-1β dépendante de NLRP3 dans ces études est majoritairement décrite comme jouant un rôle dans la progression tumorale. Au contraire, d'autres études décrivent un rôle anti-tumoral de l'activation de NLRP3 au sein des TAMs (577,578). Le modèle tumoral et le microenvironnement tumoral associé, ainsi que le stade tumoral peuvent expliquer les différences observées. La contribution de NLRP3 à l'activation des macrophages doit ainsi être plus caractérisée. Il nous paraît ainsi essentiel (i) de préciser les mécanismes moléculaires régulés par NLRP3 et impliqués dans l'activation des macrophages et (ii) préciser l'effet des rayonnements ionisants sur cette voie de signalisation cellulaire.

Il est également important de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels le récepteur purinergique P2Y2 contrôle la transcription de la protéine NLRP3. Dans la littérature, plusieurs facteurs de transcription ont été décrits comme impactant l'expression de la protéine NLRP3 : NF-κB (601), NR1D1 (*nuclear receptor subfamily 1 group D member 1*) (602), récepteur des hydrocarbures aryliques (AhR) (603), BCL6 (*B cell lymphoma* 6) (604), GFI1 (*Growth Factor Independence 1*) (605). Il serait ainsi pertinent de déterminer si le récepteur P2Y2 interagit avec l'un ou plusieurs de ces facteurs de transcription.

4. La combinaison de la radiotherapie et l'inhibition du recepteur P2Y2 augmente la capacite des macrophages irradies a etre actives de façon pro-inflammatoire.

Plusieurs études se sont intéressées à des stratégies combinatoires de la radiothérapie avec la signalisation purinergique. La plupart d'entre elles, se sont concentrées soit sur la déplétion des niveaux d'adénosine, en particulier par l'inhibition des ectonucléotidases (606) ou par l'usage d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine (557), ou soit sur l'amplification de la mort immunogène radio-induite (ICD), notamment par la surexpression du récepteur P2X7 (607). Cependant, il n'est pas décrit des études combinant la radiothérapie et la signalisation purinergique dans le but de potentialiser la reprogrammation radio-induite des macrophages.

Dans nos travaux, en plus d'avoir démontré que l'inactivation fonctionnelle de P2Y2 favorise l'activation pro-inflammatoire des macrophages, nous avons également révélé une augmentation de la reprogrammation pro-inflammatoire des macrophages irradiés lorsque P2Y2 est inactivée. En effet, nous avons montré que l'inhibition de P2Y2 permet d'amplifier l'accumulation d'ADN cytosolique, la fragmentation mitochondriale et l'activation pro-

inflammatoire des macrophages, induits après irradiation. L'effet de la combinaison sur la stabilisation de cGAS ainsi que sur l'activation de la protéine DRP1 est en cours d'étude et nous permettra de déterminer si l'inactivation de P2Y2 agit en amont ou dans l'une des étapes en aval de la voie de signalisation radio-induite décrite. Il existe ainsi un réel intérêt thérapeutique de combiner la radiothérapie et l'inhibition de P2Y2, notamment par la potentialisation des effets immunologiques anti-tumoraux radio-induits, permettant *in fine* d'améliorer l'efficacité de la RT et la réponse anti-tumorale. Ces effets restent cependant à être étudiés *in vivo*. De plus, afin d'optimiser l'efficacité de la radiothérapie, il serait intéressant d'envisager un moyen thérapeutique pour induire la déplétion de P2Y2 au niveau des macrophages et de le combiner avec des rayonnements ionisants. Une stratégie telle, permettrait de cibler spécifiquement les macrophages pro-tumoraux et d'induire leur reprogrammation sans affecter les autres types cellulaires composant le microenvironnement tumoral.

5. L'ACTIVATION PRO-INFLAMMATOIRE DES MACROPHAGES *IN VITRO*

Dans nos travaux, nous avons déterminé l'activation pro-inflammatoire des macrophages par l'induction de plusieurs marqueurs *in vitro* : la protéine iNOS et le facteur de transcription IRF5 principalement. Cette caractérisation par marqueurs *in* vitro doit être couplée avec des études fonctionnelles, afin de démontrer le caractère anti-tumoral du phénotype induit. En effet, plusieurs études montrent que les macrophages peuvent aborder des phénotypes mixtes, exprimant à la fois des marqueurs pro et anti-inflammatoires (608). En particulier, une grande majorité de travaux ont associé l'expression d'iNOS au niveau des TAMs à des fonctions anti-tumorales (274), mais certains travaux ont également associé cette expression d'iNOS à des fonctions pro-tumorales des TAMs (417). Ces disparités s'expliquent par les différents modèles tumoraux utilisés, reflétant ainsi la diversité fonctionnelle et phénotypique réelle des TAMs selon le contexte tissulaire tumoral (origine des macrophages, organe touché, niche tumoral…). Il semble ainsi pertinent dans la poursuite de nos travaux, d'aller au-delà de la biologie pure du macrophage et de prendre en compte les fonctions du macrophages dans un ensemble tissulaire et pathologique précis, afin d'étudier les fonctions des macrophages ainsi activés et de caractériser de manière plus précise leur phénotype et l'effet de notre voie de signalisation.

PERSPECTIVES

Lors de ces travaux de thèse, nous avons mis en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des macrophages induite par les radiations ionisantes, médiée par l'activation du capteur d'ADN cGAS dépendante de la protéine mitochondriale DRP1. Nous avons identifié le récepteur purinergique P2Y2 comme un répresseur endogène de la reprogrammation pro-inflammatoire des macrophages. Nous avons montré que l'inactivation fonctionnelle de ce dernier combiné à l'irradiation permet d'augmenter la capacité des macrophages à entreprendre une activation pro-inflammatoire. Enfin, dans le but de caractériser les mécanismes induits par P2Y2, nous avons révélé l'implication de la protéine NLRP3, dans l'activation pro-inflammatoire des macrophages observée à la suite de l'inactivation de P2Y2.

Dans l'ensemble, ces travaux de thèse suggèrent que l'inactivation du récepteur purinergique P2Y2 au niveau des macrophages pourrait avoir un intérêt thérapeutique seule ou en combinaison avec la radiothérapie.

En combinaison avec la radiothérapie, il nous semble intéressant d'évaluer la capacité d'ARN silencieux ou d'anticorps bloquant dirigés contre le récepteur purinergique P2Y2 ou d'agents pharmacologiques capables d'inhiber l'activité biologique du récepteur purinergique P2Y2, à induire la reprogrammation des TAMs et favoriser une réponse anti-tumorale. Un ciblage spécifique des TAMs pro-tumoraux à reprogrammer par l'utilisation d'outils de nanomédecine, tels que des nanoparticules fonctionnalisées, pourrait aussi être envisagé, afin notamment d'épargner les populations de macrophages physiologiques (les macrophages résidents ou les TAMs anti-tumoraux). Récemment Yu et *al*. ont démontré que la radiothérapie abroge la résistance à l'immunothérapie induite par les métastases hépatiques. Il a été montré que l'irradiation ciblée des métastases hépatiques participait à la reprogrammation des TAMs vers un phénotype anti-tumoral, prévenait la perte de cellules T $CD8^+$ spécifiques et augmentait la réponse systémique aux immunothérapies (258). Dans ce même modèle *in vivo*, il serait intéressant de combiner la radiothérapie avec une stratégie de nanomédecine ciblant les TAMs pro-tumoraux et induisant la déplétion de P2Y2 et voir si cela peut améliorer la réponse anti-tumorale.

Enfin, dans un contexte inflammatoire, il nous semble pertinent d'envisager l'utilisation d'agonistes ou d'induire la surexpression du récepteur purinergique P2Y2, afin d'avoir un impact négatif sur l'inflammation. Notre équipe a notamment montré l'intérêt des agonistes du récepteur P2Y2 dans la régulation négative de l'inflammasome NLRP3 et dans le traitement de l'infection au SARS-CoV-2 ainsi que dans le traitement de l'inflammation pulmonaire (**Annexe 1**).

BIBLIOGRAPHIE

1. Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. Nat Rev Mol Cell Biol. nov 2003;4(11):897-901.
2. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull World Health Organ. 1972;46(6):845-52.
3. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. Immunity. 24 janv 2013;38(1):79-91.
4. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes. Immunity. 18 avr 2013;38(4):792-804.
5. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science. 5 nov 2010;330(6005):841-5.
6. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat Rev Immunol. juin 2014;14(6):392-404.
7. Perdiguero EG, Geissmann F. The development and maintenance of resident macrophages. Nat Immunol. janv 2016;17(1):2-8.
8. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. Immunity. 15 mars 2016;44(3):439-49.
9. Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. Journal of Experimental Medicine. 16 sept 2013;210(10):1977-92.
10. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, et al. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. J Exp Med. 4 juin 2012;209(6):1167-81.
11. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Gomez Perdiguero E, Geissmann F, Henri S, et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. Nat Immunol. oct 2014;15(10):929-37.
12. Tamoutounour S, Guilliams M, Montanana Sanchis F, Liu H, Terhorst D, Malosse C, et al. Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. Immunity. 14 nov 2013;39(5):925-38.
13. Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. Journal of Experimental Medicine. 22 sept 2014;211(11):2151-8.
14. Calderon B, Carrero JA, Ferris ST, Sojka DK, Moore L, Epelman S, et al. The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. Journal of Experimental Medicine. 7 sept 2015;212(10):1497-512.
15. van Furth R, Sluiter W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. J Exp Med. 1 févr 1986;163(2):474-9.
16. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. Science. 31 juill 2009;325(5940):612-6.
17. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. Immunity. 16 oct 2018;49(4):595-613.

18. Terry RL, Miller SD. Molecular control of monocyte development. Cellular Immunology. 1 sept 2014;291(1):16-21.
19. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. Science. 6 janv 2006;311(5757):83-7.
20. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. Nat Immunol. nov 2007;8(11):1207-16.
21. Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. Nat Immunol. août 2013;14(8):821-30.
22. Kawamura S, Onai N, Miya F, Sato T, Tsunoda T, Kurabayashi K, et al. Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. Immunity. 16 mai 2017;46(5):835-848.e4.
23. Yáñez A, Coetzee SG, Olsson A, Muench DE, Berman BP, Hazelett DJ, et al. Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. Immunity. 21 nov 2017;47(5):890-902.e4.
24. Liu Z, Gu Y, Chakarov S, Bleriot C, Kwok I, Chen X, et al. Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. Cell. 5 sept 2019;178(6):1509-1525.e19.
25. Weinreb C, Rodriguez-Fraticelli A, Camargo FD, Klein AM. Lineage tracing on transcriptional landscapes links state to fate during differentiation. Science. 14 févr 2020;367(6479):eaaw3381.
26. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. Science. 21 avr 2017;356(6335):eaah4573.
27. Dutertre CA, Becht E, Irac SE, Khalilnezhad A, Narang V, Khalilnezhad S, et al. Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. Immunity. 17 sept 2019;51(3):573-589.e8.
28. Ziegler-Heitbrock L. Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. Cellular Immunology. 1 sept 2014;291(1):11-5.
29. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL. Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. Blood. 15 nov 1989;74(7):2527-34.
30. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, et al. Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. Mol Cell Biol. juin 2000;20(11):4106-14.
31. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. Immunity. 1 juill 2003;19(1):71-82.
32. Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, et al. Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response1. The Journal of Immunology. 1 avr 2004;172(7):4410-7.
33. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. Blood. 21 janv 2010;115(3):e10-9.
34. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. Immunity. 24 sept 2010;33(3):375-86.

35. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. Journal of Experimental Medicine. 12 juin 2017;214(7):1913-23.
36. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. Nat Immunol. mars 2006;7(3):311-7.
37. Hamon P, Loyher PL, Baudesson de Chanville C, Licata F, Combadière C, Boissonnas A. CX3CR1-dependent endothelial margination modulates Ly6Chigh monocyte systemic deployment upon inflammation in mice. Blood. 9 mars 2017;129(10):1296-307.
38. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. Immunity. 19 sept 2013;39(3):599-610.
39. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. Science. 3 août 2007;317(5838):666-70.
40. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al. Nr4a1-Dependent Ly6Clow Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal. Cell. 11 avr 2013;153(2):362-75.
41. Kurotaki D, Sasaki H, Tamura T. Transcriptional control of monocyte and macrophage development. International Immunology. 1 mars 2017;29(3):97-107.
42. Zhu YP, Thomas GD, Hedrick CC. Transcriptional Control of Monocyte Development. Arterioscler Thromb Vasc Biol. sept 2016;36(9):1722-33.
43. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. Nat Rev Immunol. nov 2011;11(11):788-98.
44. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. Nat Med. sept 2013;19(9):1166-72.
45. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. Annu Rev Immunol. 21 mars 2015;33(1):643-75.
46. Gibbings SL, Goyal R, Desch AN, Leach SM, Prabagar M, Atif SM, et al. Transcriptome analysis highlights the conserved difference between embryonic and postnatal-derived alveolar macrophages. Blood. 10 sept 2015;126(11):1357-66.
47. Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, et al. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. Cell. 4 déc 2014;159(6):1327-40.
48. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. Cell. 4 déc 2014;159(6):1312-26.
49. van de Laar L, Saelens W, De Prijck S, Martens L, Scott CL, Van Isterdael G, et al. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. Immunity. 19 avr 2016;44(4):755-68.
50. Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. Nat Commun. 27 janv 2016;7(1):10321.
51. Bowman RL, Klemm F, Akkari L, Pyonteck SM, Sevenich L, Quail DF, et al. Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. Cell Reports. 22 nov 2016;17(9):2445-59.

52. Weinberger T, Esfandyari D, Messerer D, Percin G, Schleifer C, Thaler R, et al. Ontogeny of arterial macrophages defines their functions in homeostasis and inflammation. Nat Commun. 11 sept 2020;11(1):4549.
53. Beattie L, Sawtell A, Mann J, Frame TCM, Teal B, de Labastida Rivera F, et al. Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. Journal of Hepatology. 1 oct 2016;65(4):758-68.
54. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. Nat Immunol. nov 2012;13(11):1118-28.
55. Aziz A, Soucie E, Sarrazin S, Sieweke MH. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. Science. 6 nov 2009;326(5954):867-71.
56. Abutbul S, Shapiro J, Szaingurten-Solodkin I, Levy N, Carmy Y, Baron R, et al. TGF-β signaling through SMAD2/3 induces the quiescent microglial phenotype within the CNS environment. Glia. juill 2012;60(7):1160-71.
57. Buttgereit A, Lelios I, Yu X, Vrohlings M, Krakoski NR, Gautier EL, et al. Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. Nat Immunol. déc 2016;17(12):1397-406.
58. Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, et al. IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. Cell Rep. 19 avr 2012;1(4):334-40.
59. Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nat Immunol. 24 juin 2012;13(8):753-60.
60. Schneider C, Nobs SP, Kurrer M, Rehrauer H, Thiele C, Kopf M. Induction of the nuclear receptor PPAR-γ by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. Nat Immunol. nov 2014;15(11):1026-37.
61. Nakamura A, Ebina-Shibuya R, Itoh-Nakadai A, Muto A, Shima H, Saigusa D, et al. Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. J Exp Med. 21 oct 2013;210(11):2191-204.
62. Haldar M, Kohyama M, So AYL, Kc W, Wu X, Briseño CG, et al. Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. Cell. 13 mars 2014;156(6):1223-34.
63. A-Gonzalez N, Guillen JA, Gallardo G, Diaz M, de la Rosa JV, Hernandez IH, et al. The nuclear receptor LXRα controls the functional specialization of splenic macrophages. Nat Immunol. août 2013;14(8):831-9.
64. Joseph SB, Bradley MN, Castrillo A, Bruhn KW, Mak PA, Pei L, et al. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. Cell. 15 oct 2004;119(2):299-309.
65. Bonnardel J, T'Jonck W, Gaublomme D, Browaeys R, Scott CL, Martens L, et al. Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. Immunity. 15 oct 2019;51(4):638-654.e9.
66. Sakai M, Troutman TD, Seidman JS, Ouyang Z, Spann NJ, Abe Y, et al. Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. Immunity. 15 oct 2019;51(4):655-670.e8.
67. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. Cell. 8 mai 2014;157(4):832-44.
68. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, et al. c-Fos: a

Key Regulator of Osteoclast-Macrophage Lineage Determination and Bone Remodeling. Science. 21 oct 1994;266(5184):443-8.
69. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. Dev Cell. déc 2002;3(6):889-901.
70. Zhang Y, Ma C, Liu C, Wu W. NF-κB promotes osteoclast differentiation by overexpressing MITF via down regulating microRNA-1276 expression. Life Sci. 1 oct 2020;258:118093.
71. Chopin M, Seillet C, Chevrier S, Wu L, Wang H, Morse HC, et al. Langerhans cells are generated by two distinct PU.1-dependent transcriptional networks. J Exp Med. 16 déc 2013;210(13):2967-80.
72. Guilliams M, Scott CL. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? Nat Rev Immunol. juill 2017;17(7):451-60.
73. Guilliams M, Thierry GR, Bonnardel J, Bajenoff M. Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. Immunity. 17 mars 2020;52(3):434-51.
74. Laviron M, Petit M, Weber-Delacroix E, Combes AJ, Arkal AR, Barthélémy S, et al. Tumor-associated macrophage heterogeneity is driven by tissue territories in breast cancer. Cell Rep. 24 mai 2022;39(8):110865.
75. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. Nat Immunol. janv 2016;17(1):34-40.
76. Friedl P, Weigelin B. Interstitial leukocyte migration and immune function. Nat Immunol. sept 2008;9(9):960-9.
77. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunology Today. 1 juin 1999;20(6):254-7.
78. Köhidai L. Chemotaxis: the proper physiological response to evaluate phylogeny of signal molecules. Acta Biol Hung. 1999;50(4):375-94.
79. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. Cell. 9 févr 1996;84(3):359-69.
80. Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends in Cell Biology. 1 mars 1995;5(3):85-7.
81. Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. Immunobiology. 1 juill 2009;214(7):562-75.
82. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. Nat Rev Immunol. sept 2013;13(9):621-34.
83. Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. J Exp Med. 1 avr 1990;171(4):1333-45.
84. van Lookeren Campagne M, Wiesmann C, Brown EJ. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. Cell Microbiol. sept 2007;9(9):2095-102.
85. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol. 1 avr 1992;148(7):2207-16.
86. Underhill DM. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. Immunological Reviews. 2007;219(1):75-87.
87. Lemke G. How macrophages deal with death. Nat Rev Immunol. sept 2019;19(9):539-49.
88. Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. Immunity. 15 mars

2016;44(3):463-75.
89. Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is up-regulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. Cell. 23 juill 2009;138(2):271-85.
90. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. Annu Rev Immunol. 2013;31:443-73.
91. Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS. Presentation of Phagocytosed Antigens by MHC Class I and II. Traffic. 2013;14(2):135-52.
92. Martinez-Pomares L, Gordon S. Antigen Presentation the Macrophage Way. Cell. 16 nov 2007;131(4):641-3.
93. Muntjewerff EM, Meesters LD, van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. Front Immunol. 2020;11:1276.
94. Asano K, Nabeyama A, Miyake Y, Qiu CH, Kurita A, Tomura M, et al. CD169-Positive Macrophages Dominate Antitumor Immunity by Crosspresenting Dead Cell-Associated Antigens. Immunity. 28 janv 2011;34(1):85-95.
95. Backer R, Schwandt T, Greuter M, Oosting M, Jüngerkes F, Tüting T, et al. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 5 janv 2010;107(1):216-21.
96. Nauseef WM. The phagocyte NOX2 NADPH oxidase in microbial killing and cell signaling. Current Opinion in Immunology. 1 oct 2019;60:130-40.
97. Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F. Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. Journal of Biological Chemistry. 25 nov 1990;265(33):20241-6.
98. Slauch JM. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. Mol Microbiol. mai 2011;80(3):580-3.
99. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. Nature. avr 2011;472(7344):476-80.
100. Hall CJ, Boyle RH, Astin JW, Flores MV, Oehlers SH, Sanderson LE, et al. Immunoresponsive Gene 1 Augments Bactericidal Activity of Macrophage-Lineage Cells by Regulating β-Oxidation-Dependent Mitochondrial ROS Production. Cell Metabolism. 6 août 2013;18(2):265-78.
101. Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Soma GI. ROS and Innate Immunity. Anticancer Research. 1 mars 2009;29(3):817-21.
102. Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li PL. Redox Regulation of NLRP3 Inflammasomes: ROS as Trigger or Effector? Antioxidants & Redox Signaling. mai 2015;22(13):1111-29.
103. Al-Shehri SS. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. Biochimie. 1 févr 2021;181:52-64.
104. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem. 18 févr 1994;269(7):4705-8.
105. Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, et al. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. Science. 18 mars 1994;263(5153):1612-5.
106. Taylor BS, Geller DA. MOLECULAR REGULATION OF THE HUMAN INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS) GENE. Shock. juin 2000;13(6):413.

107. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997;15:323-50.
108. Griffin GK, Newton G, Tarrio ML, Bu D xiu, Maganto-Garcia E, Azcutia V, et al. IL-17 and TNF-α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. J Immunol. 15 juin 2012;188(12):6287-99.
109. Vieira SM, Lemos HP, Grespan R, Napimoga MH, Dal-Secco D, Freitas A, et al. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. Br J Pharmacol. oct 2009;158(3):779-89.
110. Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL. Interleukin-1β induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. Atherosclerosis. 1 mai 1995;115(1):89-98.
111. Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, Cauchetaux S, Ratner M, Shapira I, et al. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 28 avr 2009;106(17):7119-24.
112. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. Current Opinion in Immunology. 1 févr 2000;12(1):59-63.
113. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. Immunity. juin 2001;14(6):705-14.
114. Park AY, Scott P. IL-12: Keeping Cell-Mediated Immunity Alive. Scandinavian Journal of Immunology. 2001;53(6):529-32.
115. Tominaga K, Yoshimoto T, Torigoe K, Kurimoto M, Matsui K, Hada T, et al. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1β for IFN-γ production from human T cells. International Immunology. 1 févr 2000;12(2):151-60.
116. Croxford AL, Kulig P, Becher B. IL-12-and IL-23 in health and disease. Cytokine Growth Factor Rev. août 2014;25(4):415-21.
117. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol. 1 déc 1991;147(11):3815-22.
118. Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 sept 1992;89(18):8676-80.
119. Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 14 févr 1992;182(3):1155-9.
120. Kuga S, Otsuka T, Niiro H, Nunoi H, Nemoto Y, Nakano T, et al. Suppression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase. Experimental Hematology. 20 mars 1996;24(2):151-7.
121. Chadban SJ, Tesch GH, Foti R, Lan HY, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Interleukin-10 differentially modulates MHC class II expression by mesangial cells and macrophages in vitro and in vivo. Immunology. mai 1998;94(1):72-8.
122. Travis MA, Sheppard D. TGF-β Activation and Function in Immunity. Annu Rev Immunol. 2014;32:51-82.
123. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. Annu Rev Immunol. 1998;16:27-55.
124. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory

cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. J Clin Invest. 15 janv 1998;101(2):311-20.
125. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. Nat Rev Immunol. févr 2015;15(2):87-103.
126. Benveniste EN, Qin H. Type I interferons as anti-inflammatory mediators. Sci STKE. 11 déc 2007;2007(416):pe70.
127. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends in Immunology. 1 déc 2004;25(12):677-86.
128. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest. 1 mars 2012;122(3):787-95.
129. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. F1000Prime Rep. 3 mars 2014;6:13.
130. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. Journal of Cellular Physiology. 2018;233(9):6425-40.
131. Ye J, Xie C, Wang C, Huang J, Yin Z, Heng BC, et al. Promoting musculoskeletal system soft tissue regeneration by biomaterial-mediated modulation of macrophage polarization. Bioact Mater. 21 avr 2021;6(11):4096-109.
132. Zheng XF, Hong YX, Feng GJ, Zhang GF, Rogers H, Lewis MAO, et al. Lipopolysaccharide-induced M2 to M1 macrophage transformation for IL-12p70 production is blocked by Candida albicans mediated up-regulation of EBI3 expression. PLoS One. 2013;8(5):e63967.
133. Brown JN, Wallet MA, Krastins B, Sarracino D, Goodenow MM. Proteome bioprofiles distinguish between M1 priming and activation states in human macrophages. Journal of Leukocyte Biology. 1 avr 2010;87(4):655-62.
134. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. J Leukoc Biol. juin 2013;93(6):875-81.
135. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. Immunity. 17 juill 2014;41(1):14-20.
136. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. Immunity. 20 févr 2014;40(2):274-88.
137. Li C, Menoret A, Farragher C, Ouyang Z, Bonin C, Holvoet P, et al. Single cell transcriptomics based-MacSpectrum reveals novel macrophage activation signatures in diseases. JCI Insight. 16 avr 2019;5(10):e126453, 126453.
138. Hu X, Li J, Fu M, Zhao X, Wang W. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. Sig Transduct Target Ther. 26 nov 2021;6(1):1-33.
139. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science. 3 juin 1994;264(5164):1415-21.
140. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. Nature. 18 avr 1996;380(6575):627-30.
141. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu Rev Immunol. 2009;27:451-83.
142. Williams L, Bradley L, Smith A, Foxwell B. Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages.

J Immunol. 1 janv 2004;172(1):567-76.
143. Ohmori Y, Hamilton TA. IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. J Immunol. 1 déc 1997;159(11):5474-82.
144. Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T, Nakatsukasa H. Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. Cold Spring Harb Perspect Biol. juill 2018;10(7):a028571.
145. Günthner R, Anders HJ. Interferon-Regulatory Factors Determine Macrophage Phenotype Polarization. Mediators of Inflammation. 28 nov 2013;2013:e731023.
146. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. Science. août 2003;301(5633):640-3.
147. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. Nature. oct 2009;461(7265):788-92.
148. Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl MargoE, Latz E, Goutagny N, Pitha PM, et al. The Interferon Regulatory Factor, IRF5, Is a Central Mediator of Toll-like Receptor 7 Signaling*. Journal of Biological Chemistry. 29 avr 2005;280(17):17005-12.
149. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. Nature. mars 2005;434(7030):243-9.
150. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. Nat Immunol. mars 2011;12(3):231-8.
151. Hedl M, Abraham C. IRF5 Risk Polymorphisms Contribute to Interindividual Variance in Pattern Recognition Receptor-Mediated Cytokine Secretion in Human Monocyte-Derived Cells. The Journal of Immunology. 1 juin 2012;188(11):5348-56.
152. Feng D, Stone RC, Eloranta ML, Sangster-Guity N, Nordmark G, Sigurdsson S, et al. Genetic variants and disease-associated factors contribute to enhanced interferon regulatory factor 5 expression in blood cells of patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis & Rheumatism. 2010;62(2):562-73.
153. Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LRL, Baechler EC, et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 17 avr 2007;104(16):6758-63.
154. Eames HL, Saliba DG, Krausgruber T, Lanfrancotti A, Ryzhakov G, Udalova IA. KAP1/TRIM28: An inhibitor of IRF5 function in inflammatory macrophages. Immunobiology. 1 déc 2012;217(12):1315-24.
155. Negishi H, Ohba Y, Yanai H, Takaoka A, Honma K, Yui K, et al. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. Proceedings of the National Academy of Sciences. nov 2005;102(44):15989-94.
156. Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. Nat Immunol. oct 2010;11(10):936-44.
157. Li Q, Verma IM. NF-κB regulation in the immune system. Nat Rev Immunol. oct 2002;2(10):725-34.
158. Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor–mediated NF-κB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. J Clin Invest. 1 janv 2001;107(1):13-9.
159. Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear

factor κB. Proceedings of the National Academy of Sciences. sept 2009;106(35):14978-83.
160. Ziegler-Heitbrock L. The p50-homodimer mechanism in tolerance to LPS. J Endotoxin Res. 2001;7(3):219-22.
161. Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, et al. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. Cancer Res. 1 déc 2006;66(23):11432-40.
162. Bradley MN, Zhou L, Smale ST. C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Mol Cell Biol. juill 2003;23(14):4841-58.
163. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, et al. A CREB-C/EBPβ cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. Proc Natl Acad Sci U S A. 13 oct 2009;106(41):17475-80.
164. Lee B, Qiao L, Lu M, Yoo HS, Cheung W, Mak R, et al. C/EBPα regulates macrophage activation and systemic metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab. 15 mai 2014;306(10):E1144-54.
165. Rigamonti E, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. Arterioscler Thromb Vasc Biol. juin 2008;28(6):1050-9.
166. Penas F, Mirkin GA, Vera M, Cevey Á, González CD, Gómez MI, et al. Treatment in vitro with PPARα and PPARγ ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice. Biochim Biophys Acta. mai 2015;1852(5):893-904.
167. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. Nature. 7 nov 1996;384(6604):39-43.
168. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. Nature. 1 janv 1998;391(6662):79-82.
169. Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, Barta E, Dezso B, Pap A, et al. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPARγ-regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. Immunity. 24 nov 2010;33(5):699-712.
170. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Red Eagle A, Vats D, Morel CR, Goforth MH, et al. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. Cell Metab. juin 2008;7(6):496-507.
171. McConnell BB, Yang VW. Mammalian Krüppel-Like Factors in Health and Diseases. Physiological Reviews. oct 2010;90(4):1337-81.
172. Mahabeleshwar GH, Kawanami D, Sharma N, Takami Y, Zhou G, Shi H, et al. The Myeloid Transcription Factor KLF2 Regulates the Host Response to Polymicrobial Infection and Endotoxic Shock. Immunity. 27 mai 2011;34(5):715-28.
173. Knights AJ, Yang L, Shah M, Norton LJ, Green GS, Stout ES, et al. Krüppel-like factor 3 (KLF3) suppresses NF-κB-driven inflammation in mice. J Biol Chem. 1 mai 2020;295(18):6080-91.
174. Date D, Das R, Narla G, Simon DI, Jain MK, Mahabeleshwar GH. Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. J Biol Chem. 11 avr 2014;289(15):10318-29.
175. Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, et al. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. J Clin Invest. juill 2011;121(7):2736-49.
176. Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. 1 sept 2008;1777(9):1092-7.

177. Vafai SB, Mootha VK. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. Nature. nov 2012;491(7424):374-83.
178. Chan DC. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. Annu Rev Genet. 2012;46:265-87.
179. Archer SL. Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. N Engl J Med. 5 déc 2013;369(23):2236-51.
180. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. Science. 21 oct 2011;334(6054):358-62.
181. Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. Science. 25 janv 2013;339(6118):464-7.
182. Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. Ann N Y Acad Sci. juill 2010;1201:34-9.
183. Rambold AS, Pearce EL. Mitochondrial Dynamics at the Interface of Immune Cell Metabolism and Function. Trends in Immunology. 1 janv 2018;39(1):6-18.
184. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol. nov 2007;8(11):870-9.
185. Buck MD, O'Sullivan D, Klein Geltink RI, Curtis JD, Chang CH, Sanin DE, et al. Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. Cell. 30 juin 2016;166(1):63-76.
186. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature. janv 2011;469(7329):221-5.
187. Tur J, Pereira-Lopes S, Vico T, Marín EA, Muñoz JP, Hernández-Alvarez M, et al. Mitofusin 2 in Macrophages Links Mitochondrial ROS Production, Cytokine Release, Phagocytosis, Autophagy, and Bactericidal Activity. Cell Rep. 25 août 2020;32(8):108079.
188. Lloberas J, Muñoz JP, Hernández-Álvarez MI, Cardona PJ, Zorzano A, Celada A. Macrophage mitochondrial MFN2 (mitofusin 2) links immune stress and immune response through reactive oxygen species (ROS) production. Autophagy. 16(12):2307-9.
189. Khodzhaeva V, Schreiber Y, Geisslinger G, Brandes RP, Brüne B, Namgaladze D. Mitofusin 2 Deficiency Causes Pro-Inflammatory Effects in Human Primary Macrophages. Front Immunol. 12 août 2021;12:723683.
190. Kapetanovic R, Afroz SF, Ramnath D, Lawrence GM, Okada T, Curson JE, et al. Lipopolysaccharide promotes Drp1-dependent mitochondrial fission and associated inflammatory responses in macrophages. Immunol Cell Biol. août 2020;98(7):528-39.
191. Yu W, Wang X, Zhao J, Liu R, Liu J, Wang Z, et al. Stat2-Drp1 mediated mitochondrial mass increase is necessary for pro-inflammatory differentiation of macrophages. Redox Biology. 1 oct 2020;37:101761.
192. Gao F, Reynolds MB, Passalacqua KD, Sexton JZ, Abuaita BH, O'Riordan MXD. The Mitochondrial Fission Regulator DRP1 Controls Post-Transcriptional Regulation of TNF-α. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:593805.
193. Zhang Q, Wei J, Liu Z, Huang X, Sun M, Lai W, et al. STING signaling sensing of DRP1-dependent mtDNA release in kupffer cells contributes to lipopolysaccharide-induced liver injury in mice. Redox Biology. 1 août 2022;54:102367.
194. Chen S, Yang J, Wei Y, Wei X. Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. Cell Mol Immunol. janv 2020;17(1):36-49.
195. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol Mol Biol Rev. juin 2000;64(2):435-59.
196. Mullican SE, Gaddis CA, Alenghat T, Nair MG, Giacomin PR, Everett LJ, et al. Histone

deacetylase 3 is an epigenomic brake in macrophage alternative activation. Genes Dev. 1 déc 2011;25(23):2480-8.
197. Czimmerer Z, Daniel B, Horvath A, Rückerl D, Nagy G, Kiss M, et al. The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages. Immunity. 16 janv 2018;48(1):75-90.e6.
198. Yan B, Xie S, Liu Z, Ran J, Li Y, Wang J, et al. HDAC6 deacetylase activity is critical for lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. PLoS One. 2014;9(10):e110718.
199. Shakespear MR, Hohenhaus DM, Kelly GM, Kamal NA, Gupta P, Labzin LI, et al. Histone deacetylase 7 promotes Toll-like receptor 4-dependent proinflammatory gene expression in macrophages. J Biol Chem. 30 août 2013;288(35):25362-74.
200. Kittan NA, Allen RM, Dhaliwal A, Cavassani KA, Schaller M, Gallagher KA, et al. Cytokine Induced Phenotypic and Epigenetic Signatures Are Key to Establishing Specific Macrophage Phenotypes. PLoS One. 21 oct 2013;8(10):e78045.
201. Qiao Y, Kang K, Giannopoulou E, Fang C, Ivashkiv LB. IFN-γ Induces Histone 3 Lysine 27 Trimethylation in a Small Subset of Promoters to Stably Silence Gene Expression in Human Macrophages. Cell Rep. 20 sept 2016;16(12):3121-9.
202. Cheng C, Huang C, Ma TT, Bian EB, He Y, Zhang L, et al. SOCS1 hypermethylation mediated by DNMT1 is associated with lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokines in macrophages. Toxicol Lett. 21 mars 2014;225(3):488-97.
203. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. Proceedings of the National Academy of Sciences. 30 janv 2007;104(5):1604-9.
204. McCoy CE, Sheedy FJ, Qualls JE, Doyle SL, Quinn SR, Murray PJ, et al. IL-10 Inhibits miR-155 Induction by Toll-like Receptors*. Journal of Biological Chemistry. 1 juill 2010;285(27):20492-8.
205. Cai X, Yin Y, Li N, Zhu D, Zhang J, Zhang CY, et al. Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. Journal of Molecular Cell Biology. 1 oct 2012;4(5):341-3.
206. Du F, Yu F, Wang Y, Hui Y, Carnevale K, Fu M, et al. MicroRNA-155 Deficiency Results in Decreased Macrophage Inflammation and Attenuated Atherogenesis in Apolipoprotein E–Deficient Mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. avr 2014;34(4):759-67.
207. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. Nat Immunol. févr 2010;11(2):141-7.
208. Udalova IA, Mantovani A, Feldmann M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. août 2016;12(8):472-85.
209. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. Nat Rev Immunol. juin 2020;20(6):355-62.
210. Park MD, Silvin A, Ginhoux F, Merad M. Macrophages in health and disease. Cell. 10 nov 2022;185(23):4259-79.
211. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature. avr 2013;496(7446):445-55.
212. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Cell. 29 avr 2011;145(3):341-55.
213. Li X, Liu R, Su X, Pan Y, Han X, Shao C, et al. Harnessing tumor-associated macrophages as aids for cancer immunotherapy. Mol Cancer. 5 déc 2019;18:177.
214. Anderson NM, Simon MC. The tumor microenvironment. Current Biology. 17 août

2020;30(16):R921-5.
215. Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. Trends Immunol. avr 2019;40(4):310-27.
216. Cassetta L, Pollard JW. A timeline of tumour-associated macrophage biology. Nat Rev Cancer. avr 2023;23(4):238-57.
217. Yan Y, Zhang J, Li JH, Liu X, Wang JZ, Qu HY, et al. High tumor-associated macrophages infiltration is associated with poor prognosis and may contribute to the phenomenon of epithelial–mesenchymal transition in gastric cancer. OncoTargets and Therapy. 31 déc 2016;9:3975-83.
218. Seminerio I, Kindt N, Descamps G, Bellier J, Lechien JR, Mat Q, et al. High infiltration of CD68+ macrophages is associated with poor prognoses of head and neck squamous cell carcinoma patients and is influenced by human papillomavirus. Oncotarget. 24 janv 2018;9(13):11046-59.
219. Fujiwara T, Fukushi J ichi, Yamamoto S, Matsumoto Y, Setsu N, Oda Y, et al. Macrophage Infiltration Predicts a Poor Prognosis for Human Ewing Sarcoma. The American Journal of Pathology. 1 sept 2011;179(3):1157-70.
220. Ding T, Xu J, Wang F, Shi M, Zhang Y, Li SP, et al. High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection. Human Pathology. 1 mars 2009;40(3):381-9.
221. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, et al. The Cellular and Molecular Origin of Tumor-associated Macrophages. Science. 23 mai 2014;344(6186):921-5.
222. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK, Kim KW, Knolhoff BL, Zuo C, et al. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. Immunity. 15 août 2017;47(2):323-338.e6.
223. Loyher PL, Hamon P, Laviron M, Meghraoui-Kheddar A, Goncalves E, Deng Z, et al. Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. J Exp Med. 1 oct 2018;215(10):2536-53.
224. Kielbassa K, Vegna S, Ramirez C, Akkari L. Understanding the Origin and Diversity of Macrophages to Tailor Their Targeting in Solid Cancers. Front Immunol. 2019;10:2215.
225. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. Nature. juill 2011;475(7355):222-5.
226. Laviron M, Boissonnas A. Ontogeny of Tumor-Associated Macrophages. Front Immunol. 2019;10:1799.
227. Casanova-Acebes M, Dalla E, Leader AM, LeBerichel J, Nikolic J, Morales BM, et al. Tissue-resident macrophages provide a pro-tumorigenic niche to early NSCLC cells. Nature. juill 2021;595(7868):578-84.
228. Baer JM, Zuo C, Kang LI, Lastra AA de la, Borcherding NC, Knolhoff BL, et al. Pancreas resident macrophage-induced fibrosis has divergent roles in pancreas inflammatory injury and PDAC [Internet]. bioRxiv; 2022 [cité 27 juin 2023]. p. 2022.02.09.479745. Disponible sur: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.09.479745v1
229. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J Leukoc Biol. nov 2009;86(5):1065-73.
230. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. Nat Rev Clin Oncol. juill 2017;14(7):399-416.
231. Kloosterman DJ, Akkari L. Macrophages at the interface of the co-evolving cancer ecosystem. Cell. 13 avr 2023;186(8):1627-51.

232. Lecoultre M, Dutoit V, Walker PR. Phagocytic function of tumor-associated macrophages as a key determinant of tumor progression control: a review. J Immunother Cancer. 1 déc 2020;8(2):e001408.
233. Vaught D, Stanford J, Cook R. Efferocytosis creates a tumor microenvironment supportive of tumor survival and metastasis. Cancer cell & microenvironment. 1 janv 2015;2.
234. Kim JJ, Lee SB, Park JK, Yoo YD. TNF-α-induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. Cell Death Differ. sept 2010;17(9):1420-34.
235. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. Exp Mol Med. févr 2020;52(2):192-203.
236. Perez-Diez A, Liu X, Matzinger P. Neoantigen Presentation and IFNγ Signaling on the Same Tumor-associated Macrophage are Necessary for CD4 T Cell–mediated Antitumor Activity in Mice. Cancer Research Communications. 9 mai 2022;2(5):316-29.
237. Dhatchinamoorthy K, Colbert JD, Rock KL. Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. Front Immunol. 2021;12:636568.
238. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. Immunity. 17 juill 2014;41(1):49-61.
239. Quaranta V, Schmid MC. Macrophage-Mediated Subversion of Anti-Tumour Immunity. Cells. 19 juill 2019;8(7):747.
240. Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CMT, Pryer N, et al. Macrophage IL-10 Blocks CD8+ T Cell-Dependent Responses to Chemotherapy by Suppressing IL-12 Expression in Intratumoral Dendritic Cells. Cancer Cell. 10 nov 2014;26(5):623-37.
241. Tiwari JK, Negi S, Kashyap M, Nizamuddin S, Singh A, Khattri A. Pan-Cancer Analysis Shows Enrichment of Macrophages, Overexpression of Checkpoint Molecules, Inhibitory Cytokines, and Immune Exhaustion Signatures in EMT-High Tumors. Front Oncol. 2021;11:793881.
242. Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. Clin Dev Immunol. 2012;2012:948098.
243. Zhu Q, Wu X, Wu Y, Wang X. Interaction between Treg cells and tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of epithelial ovarian cancer. Oncology Reports. 1 déc 2016;36(6):3472-8.
244. Sun W, Wei FQ, Li WJ, Wei JW, Zhong H, Wen YH, et al. A positive-feedback loop between tumour infiltrating activated Treg cells and type 2-skewed macrophages is essential for progression of laryngeal squamous cell carcinoma. Br J Cancer. nov 2017;117(11):1631-43.
245. Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspollini MR, Baroni G, et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. Oncogene. mai 2014;33(19):2423-31.
246. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 1 août 2009;1796(1):11-8.
247. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol. juin 2019;19(6):369-82.
248. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer. janv 2004;4(1):71-8.
249. Bonde AK, Tischler V, Kumar S, Soltermann A, Schwendener RA. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. BMC Cancer. 24 janv 2012;12(1):35.

250. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. Cell. 2 avr 2010;141(1):52-67.
251. Harney AS, Arwert EN, Entenberg D, Wang Y, Guo P, Qian BZ, et al. Real-Time Imaging Reveals Local, Transient Vascular Permeability, and Tumor Cell Intravasation Stimulated by TIE2hi Macrophage–Derived VEGFA. Cancer Discovery. 1 sept 2015;5(9):932-43.
252. Chen Q, Zhang XHF, Massagué J. Macrophage Binding to Receptor VCAM-1 Transmits Survival Signals in Breast Cancer Cells that Invade the Lungs. Cancer Cell. 18 oct 2011;20(4):538-49.
253. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, et al. The S100A8–serum amyloid A3–TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. Nat Cell Biol. nov 2008;10(11):1349-55.
254. Strilic B, Offermanns S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. Cancer Cell. 11 sept 2017;32(3):282-93.
255. Pittet MJ, Michielin O, Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. Nat Rev Clin Oncol. juin 2022;19(6):402-21.
256. Su P, Jiang L, Zhang Y, Yu T, Kang W, Liu Y, et al. Crosstalk between tumor-associated macrophages and tumor cells promotes chemoresistance via CXCL5/PI3K/AKT/mTOR pathway in gastric cancer. Cancer Cell International. 23 sept 2022;22(1):290.
257. Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, Feuillet V, Barrin S, Kantari-Mimoun C, et al. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti–PD-1 treatment. Proceedings of the National Academy of Sciences. 24 avr 2018;115(17):E4041-50.
258. Yu J, Green MD, Li S, Sun Y, Journey SN, Choi JE, et al. Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination. Nat Med. janv 2021;27(1):152-64.
259. Gartung A, Yang J, Sukhatme VP, Bielenberg DR, Fernandes D, Chang J, et al. Suppression of chemotherapy-induced cytokine/lipid mediator surge and ovarian cancer by a dual COX-2/sEH inhibitor. Proceedings of the National Academy of Sciences. 29 janv 2019;116(5):1698-703.
260. Hughes R, Qian BZ, Rowan C, Muthana M, Keklikoglou I, Olson OC, et al. Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy. Cancer Research. 31 août 2015;75(17):3479-91.
261. Aldinucci D, Borghese C, Casagrande N. The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression. Cancers. juill 2020;12(7):1765.
262. Salvagno C, Ciampricotti M, Tuit S, Hau CS, van Weverwijk A, Coffelt SB, et al. Therapeutic targeting of macrophages enhances chemotherapy efficacy by unleashing type I interferon response. Nat Cell Biol. avr 2019;21(4):511-21.
263. Akkari L, Bowman RL, Tessier J, Klemm F, Handgraaf SM, de Groot M, et al. Dynamic changes in glioma macrophage populations after radiotherapy reveal CSF-1R inhibition as a strategy to overcome resistance. Science Translational Medicine. 15 juill 2020;12(552):eaaw7843.
264. Lamb YN. Pexidartinib: First Approval. Drugs. nov 2019;79(16):1805-12.
265. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. Cell. 23 juill 2009;138(2):286-99.
266. Jiang Z, Sun H, Yu J, Tian W, Song Y. Targeting CD47 for cancer immunotherapy. J Hematol Oncol. 30 oct 2021;14(1):180.

267. Morales A, Eidinger D. Bacillus Calmette-Guerin in the Treatment of Adenocarcinoma of the Kidney. Journal of Urology. avr 1976;115(4):377-80.
268. Mantovani A, Allavena P, Marchesi F, Garlanda C. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. Nat Rev Drug Discov. nov 2022;21(11):799-820.
269. Migliorini D, Dutoit V, Allard M, Grandjean Hallez N, Marinari E, Widmer V, et al. Phase I/II trial testing safety and immunogenicity of the multipeptide IMA950/poly-ICLC vaccine in newly diagnosed adult malignant astrocytoma patients. Neuro Oncol. 11 juill 2019;21(7):923-33.
270. Ribas A, Medina T, Kirkwood JM, Zakharia Y, Gonzalez R, Davar D, et al. Overcoming PD-1 Blockade Resistance with CpG-A Toll-Like Receptor 9 Agonist Vidutolimod in Patients with Metastatic Melanoma. Cancer Discov. 1 déc 2021;11(12):2998-3007.
271. Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, Lu XM, Best A, Zeeman M, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. Nat Biotechnol. août 2020;38(8):947-53.
272. Wang Y, Lin YX, Qiao SL, An HW, Ma Y, Qiao ZY, et al. Polymeric nanoparticles promote macrophage reversal from M2 to M1 phenotypes in the tumor microenvironment. Biomaterials. 1 janv 2017;112:153-63.
273. Scodeller P, Simón-Gracia L, Kopanchuk S, Tobi A, Kilk K, Säälik P, et al. Precision Targeting of Tumor Macrophages with a CD206 Binding Peptide. Sci Rep. 7 nov 2017;7(1):14655.
274. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, et al. Low-Dose Irradiation Programs Macrophage Differentiation to an iNOS+/M1 Phenotype that Orchestrates Effective T Cell Immunotherapy. Cancer Cell. 11 nov 2013;24(5):589-602.
275. Rodell CB, Arlauckas SP, Cuccarese MF, Garris CS, Li R, Ahmed MS, et al. TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. Nat Biomed Eng. août 2018;2(8):578-88.
276. Vonderheide RH. The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint. Cancer Cell. 9 avr 2018;33(4):563-9.
277. Lam KC, Araya RE, Huang A, Chen Q, Di Modica M, Rodrigues RR, et al. Microbiota triggers STING-type I IFN-dependent monocyte reprogramming of the tumor microenvironment. Cell. 14 oct 2021;184(21):5338-5356.e21.
278. Wang Q, Bergholz JS, Ding L, Lin Z, Kabraji SK, Hughes ME, et al. STING agonism reprograms tumor-associated macrophages and overcomes resistance to PARP inhibition in BRCA1-deficient models of breast cancer. Nat Commun. 31 mai 2022;13(1):3022.
279. Binnewies M, Pollack JL, Rudolph J, Dash S, Abushawish M, Lee T, et al. Targeting TREM2 on tumor-associated macrophages enhances immunotherapy. Cell Reports. 19 oct 2021;37(3):109844.
280. Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, Li H, Leem CJ, Gorjestani S, et al. PI3Kγ is a molecular switch that controls immune suppression. Nature. 17 nov 2016;539(7629):437-42.
281. Eisinger S, Sarhan D, Boura VF, Ibarlucea-Benitez I, Tyystjärvi S, Oliynyk G, et al. Targeting a scavenger receptor on tumor-associated macrophages activates tumor cell killing by natural killer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 déc 2020;117(50):32005-16.
282. Georgoudaki AM, Prokopec KE, Boura VF, Hellqvist E, Sohn S, Östling J, et al. Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis. Cell Reports. 31 mai 2016;15(9):2000-11.
283. Guerriero JL, Sotayo A, Ponichtera HE, Castrillon JA, Pourzia AL, Schad S, et al. Class IIa HDAC inhibition reduces breast tumours and metastases through anti-tumour

macrophages. Nature. 16 mars 2017;543(7645):428-32.
284. Thariat J, Hannoun-Levi JM, Sun Myint A, Vuong T, Gérard JP. Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients. Nat Rev Clin Oncol. janv 2013;10(1):52-60.
285. Chaput G, Regnier L. Radiotherapy. Can Fam Physician. oct 2021;67(10):753-7.
286. Spencer K, Parrish R, Barton R, Henry A. Palliative radiotherapy. BMJ. 23 mars 2018;360:k821.
287. Koka K, Verma A, Dwarakanath BS, Papineni RVL. Technological Advancements in External Beam Radiation Therapy (EBRT): An Indispensable Tool for Cancer Treatment. Cancer Manag Res. 11 avr 2022;14:1421-9.
288. Taylor A, Powell MEB. Intensity-modulated radiotherapy--what is it? Cancer Imaging. 26 mars 2004;4(2):68-73.
289. Gupta T, Narayan CA. Image-guided radiation therapy: Physician's perspectives. J Med Phys. oct 2012;37(4):174-82.
290. Chang BK, Timmerman RD. Stereotactic body radiation therapy: a comprehensive review. Am J Clin Oncol. déc 2007;30(6):637-44.
291. Mohan R. A Review of Proton Therapy - Current Status and Future Directions. Precis Radiat Oncol. juin 2022;6(2):164-76.
292. Lin B, Gao F, Yang Y, Wu D, Zhang Y, Feng G, et al. FLASH Radiotherapy: History and Future. Front Oncol. 25 mai 2021;11:644400.
293. Favaudon V, Caplier L, Monceau V, Pouzoulet F, Sayarath M, Fouillade C, et al. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. Sci Transl Med. 16 juill 2014;6(245):245ra93.
294. Vozenin MC, De Fornel P, Petersson K, Favaudon V, Jaccard M, Germond JF, et al. The Advantage of FLASH Radiotherapy Confirmed in Mini-pig and Cat-cancer Patients. Clin Cancer Res. 1 janv 2019;25(1):35-42.
295. Bourhis J, Sozzi WJ, Jorge PG, Gaide O, Bailat C, Duclos F, et al. Treatment of a first patient with FLASH-radiotherapy. Radiother Oncol. oct 2019;139:18-22.
296. Mott JHL, Daniel JM. Interactions of Electromagnetic Radiation and Subatomic Particles with Matter – Part 1. Clinical Oncology. 1 juill 2021;33(7):451-4.
297. Desouky O, Ding N, Zhou G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 1 avr 2015;8(2):247-54.
298. Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1988;35:95-125.
299. Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P. Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. Clinical Oncology. 1 oct 2013;25(10):578-85.
300. Goldstein M, Kastan MB. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. Annu Rev Med. 2015;66:129-43.
301. Vallard A, Rancoule C, Guy JB, Espenel S, Sauvaigo S, Rodriguez-Lafrasse C, et al. Radiothérapie et biomarqueurs de la réparation de l'ADN. Bulletin du Cancer. 1 nov 2017;104(11):981-7.
302. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature. nov 2004;432(7015):316-23.
303. Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer Cell. mai 2003;3(5):421-9.
304. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. Nat Genet. mars 2002;30(3):285-9.
305. Sulli G, Di Micco R, di Fagagna F d'Adda. Crosstalk between chromatin state and DNA

damage response in cellular senescence and cancer. Nat Rev Cancer. oct 2012;12(10):709-20.
306. Cromie GA, Connelly JC, Leach DRF. Recombination at Double-Strand Breaks and DNA Ends: Conserved Mechanisms from Phage to Humans. Molecular Cell. 1 déc 2001;8(6):1163-74.
307. Chaudhry MA. Base excision repair of ionizing radiation-induced DNA damage in G1 and G2 cell cycle phases. Cancer Cell Int. 24 sept 2007;7:15.
308. Mladenov E, Magin S, Soni A, Iliakis G. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. Front Oncol. 2013;3:113.
309. Chen Z, Cao K, Xia Y, Li Y, Hou Y, Wang L, et al. Cellular senescence in ionizing radiation (Review). Oncology Reports. 1 sept 2019;42(3):883-94.
310. Santivasi WL, Xia F. Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. Antioxidants & Redox Signaling. 10 juill 2014;21(2):251-9.
311. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science. 7 oct 1994;266(5182):66-71.
312. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature. 21 déc 1995;378(6559):789-92.
313. Chen M, Linstra R, van Vugt MATM. Genomic instability, inflammatory signaling and response to cancer immunotherapy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 1 janv 2022;1877(1):188661.
314. Huang L, Snyder AR, Morgan WF. Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. Oncogene. sept 2003;22(37):5848-54.
315. Durante M, Formenti SC. Radiation-Induced Chromosomal Aberrations and Immunotherapy: Micronuclei, Cytosolic DNA, and Interferon-Production Pathway. Front Oncol. 2018;8:192.
316. Lee TK, O'Brien KF, Naves JL, Christie KI, Arastu HH, Eaves GS, et al. Micronuclei in lymphocytes of prostate cancer patients undergoing radiation therapy. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 21 août 2000;469(1):63-70.
317. Kwon M, Leibowitz ML, Lee JH. Small but mighty: the causes and consequences of micronucleus rupture. Exp Mol Med. nov 2020;52(11):1777-86.
318. Hatch EM, Fischer AH, Deerinck TJ, Hetzer MW. Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei. Cell. 3 juill 2013;154(1):47-60.
319. Kam WWY, Banati RB. Effects of ionizing radiation on mitochondria. Free Radical Biology and Medicine. 1 déc 2013;65:607-19.
320. Indo HP, Davidson M, Yen HC, Suenaga S, Tomita K, Nishii T, et al. Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. Mitochondrion. 1 févr 2007;7(1):106-18.
321. Walsh DWM, Siebenwirth C, Greubel C, Ilicic K, Reindl J, Girst S, et al. Live cell imaging of mitochondria following targeted irradiation in situ reveals rapid and highly localized loss of membrane potential. Sci Rep. 25 avr 2017;7(1):46684.
322. Dayal D, Martin SM, Owens KM, Aykin-Burns N, Zhu Y, Boominathan A, et al. Mitochondrial Complex II Dysfunction Can Contribute Significantly to Genomic Instability after Exposure to Ionizing Radiation. rare. déc 2009;172(6):737-45.
323. Nugent SME, Mothersill CE, Seymour C, McClean B, Lyng FM, Murphy JEJ. Increased Mitochondrial Mass in Cells with Functionally Compromised Mitochondria after Exposure to both Direct γ Radiation and Bystander Factors. Radiation Research. 1 juill 2007;168(1):134-42.

324. Zhou X, Li N, Wang Y, Wang Y, Zhang X, Zhang H. Effects of X-irradiation on mitochondrial DNA damage and its supercoiling formation change. Mitochondrion. 1 nov 2011;11(6):886-92.
325. Kobashigawa S, Suzuki K, Yamashita S. Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 4 nov 2011;414(4):795-800.
326. Jin X, Li F, Liu B, Zheng X, Li H, Ye F, et al. Different mitochondrial fragmentation after irradiation with X-rays and carbon ions in HeLa cells and its influence on cellular apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 12 juin 2018;500(4):958-65.
327. Han C, Liu Z, Zhang Y, Shen A, Dong C, Zhang A, et al. Tumor cells suppress radiation-induced immunity by hijacking caspase 9 signaling. Nat Immunol. mai 2020;21(5):546-54.
328. Li JY, Zhao Y, Gong S, Wang MM, Liu X, He QM, et al. TRIM21 inhibits irradiation-induced mitochondrial DNA release and impairs antitumour immunity in nasopharyngeal carcinoma tumour models. Nat Commun. 16 févr 2023;14(1):865.
329. Riley JS, Quarato G, Cloix C, Lopez J, O'Prey J, Pearson M, et al. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. The EMBO Journal. 3 sept 2018;37(17):e99238.
330. Wu Q, Allouch A, Martins I, Brenner C, Modjtahedi N, Deutsch E, et al. Modulating Both Tumor Cell Death and Innate Immunity Is Essential for Improving Radiation Therapy Effectiveness. Front Immunol. 2017;8:613.
331. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. Cell Death & Differentiation. 1 juill 2007;14(7):1237-43.
332. Contassot E, Gaide O, French LE. Death receptors and apoptosis. Dermatol Clin. oct 2007;25(4):487-501, vii.
333. Rehemtulla A, Hamilton CA, Chinnaiyan AM, Dixit VM. Ultraviolet Radiation-induced Apoptosis Is Mediated by Activation of CD-95 (Fas/APO-1) *. Journal of Biological Chemistry. 10 oct 1997;272(41):25783-6.
334. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat Rev Mol Cell Biol. déc 2008;9(12):1004-10.
335. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. Physiological Reviews. oct 2010;90(4):1383-435.
336. Ko A, Kanehisa A, Martins I, Senovilla L, Chargari C, Dugue D, et al. Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. Cell Death Differ. janv 2014;21(1):92-9.
337. Zeng X, Kinsella TJ. Impact of Autophagy on Chemotherapy and Radiotherapy Mediated Tumor Cytotoxicity: « To Live or not to Live ». Front Oncol. 2011;1:30.
338. Wilson EN, Bristol ML, Di X, Maltese WA, Koterba K, Beckman MJ, et al. A switch between cytoprotective and cytotoxic autophagy in the radiosensitization of breast tumor cells by chloroquine and vitamin D. Horm Cancer. oct 2011;2(5):272-85.
339. Classen F, Kranz P, Riffkin H, Pompsch M, Wolf A, Göpelt K, et al. Autophagy induced by ionizing radiation promotes cell death over survival in human colorectal cancer cells. Exp Cell Res. 1 janv 2019;374(1):29-37.
340. Jo GH, Bögler O, Chwae YJ, Yoo H, Lee SH, Park JB, et al. Radiation-Induced Autophagy Contributes to Cell Death and Induces Apoptosis Partly in Malignant Glioma Cells. Cancer

Res Treat. 29 août 2014;47(2):221-41.
341. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. Molecular cancer therapeutics. sept 2011;10(9):1533.
342. Nehs MA, Lin CI, Kozono DE, Whang EE, Cho NL, Zhu K, et al. Necroptosis is a novel mechanism of radiation-induced cell death in anaplastic thyroid and adrenocortical cancers. Surgery. 1 déc 2011;150(6):1032-9.
343. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. Nat Rev Mol Cell Biol. oct 2010;11(10):700-14.
344. Rainaldi G, Ferrante A, Indovina PL, Santini MT. Induction of apoptosis or necrosis by ionizing radiation is dose-dependent in MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids. Anticancer Res. 1 mai 2003;23(3B):2505-18.
345. Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. Nat Rev Mol Cell Biol. juin 2011;12(6):385-92.
346. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. Tumour Biol. août 2010;31(4):363-72.
347. Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. Oncogene. juill 2005;24(30):4765-77.
348. Martins I, Raza SQ, Voisin L, Dakhli H, Law F, De Jong D, et al. Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death. Biomedical Journal. 1 juin 2017;40(3):133-40.
349. Florey O, Kim SE, Sandoval CP, Haynes CM, Overholtzer M. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. Nat Cell Biol. nov 2011;13(11):1335-43.
350. Mlynarczuk-Bialy I, Dziuba I, Sarnecka A, Platos E, Kowalczyk M, Pels KK, et al. Entosis: From Cell Biology to Clinical Cancer Pathology. Cancers (Basel). 1 sept 2020;12(9):2481.
351. Zhang X, Niu Z, Qin H, Fan J, Wang M, Zhang B, et al. Subtype-Based Prognostic Analysis of Cell-in-Cell Structures in Early Breast Cancer. Front Oncol. 2019;9:895.
352. Hayashi A, Yavas A, McIntyre CA, Ho YJ, Erakky A, Wong W, et al. Genetic and clinical correlates of entosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. Mod Pathol. sept 2020;33(9):1822-31.
353. Martins I, Raza SQ, Voisin L, Dakhli H, Allouch A, Law F, et al. Anticancer chemotherapy and radiotherapy trigger both non-cell-autonomous and cell-autonomous death. Cell Death Dis. 18 juin 2018;9(7):716.
354. Sabin RJ, Anderson RM. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. Genome Integrity. 11 août 2011;2(1):7.
355. Wang M, Morsbach F, Sander D, Gheorghiu L, Nanda A, Benes C, et al. EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks. Cancer Res. 1 oct 2011;71(19):6261-9.
356. Hess J, Unger K, Orth M, Schötz U, Schüttrumpf L, Zangen V, et al. Genomic amplification of Fanconi anemia complementation group A (FancA) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Cellular mechanisms of radioresistance and clinical relevance. Cancer Letters. 1 févr 2017;386:87-99.
357. Mole RH. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? Br J Radiol. mai 1953;26(305):234-41.
358. Mirjolet C, Truc G. Effet abscopal : mythe ou réalité ? Cancer/Radiothérapie. 1 oct 2021;25(6):533-6.

359. Abuodeh Y, Venkat P, Kim S. Systematic review of case reports on the abscopal effect. Curr Probl Cancer. 2016;40(1):25-37.
360. Pevzner AM, Tsyganov MM, Ibragimova MK, Litvyakov NV. Abscopal effect in the radio and immunotherapy. Radiat Oncol J. déc 2021;39(4):247-53.
361. Okuma K, Yamashita H, Niibe Y, Hayakawa K, Nakagawa K. Abscopal effect of radiation on lung metastases of hepatocellular carcinoma: a case report. J Med Case Rep. 19 mars 2011;5:111.
362. Chicas-Sett R, Morales-Orue I, Rodriguez-Abreu D, Lara-Jimenez P. Combining radiotherapy and ipilimumab induces clinically relevant radiation-induced abscopal effects in metastatic melanoma patients: A systematic review. Clinical and Translational Radiation Oncology. 1 févr 2018;9:5-11.
363. Sun R, Sbai A, Ganem G, Boudabous M, Collin F, Marcy PY, et al. Effets non ciblés (bystander, abscopal) de la radiothérapie externe : potentielles implications pour le clinicien ? Cancer/Radiothérapie. 1 déc 2014;18(8):770-8.
364. Daguenet E, Louati S, Wozny AS, Vial N, Gras M, Guy JB, et al. Radiation-induced bystander and abscopal effects: important lessons from preclinical models. Br J Cancer. août 2020;123(3):339-48.
365. Goldberg Z, Lehnert BE. Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. Int J Oncol. août 2002;21(2):337-49.
366. Galluzzi L, Vitale I, Warren S, Adjemian S, Agostinis P, Martinez AB, et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. J Immunother Cancer. 1 mars 2020;8(1):e000337.
367. Zhu M, Yang M, Zhang J, Yin Y, Fan X, Zhang Y, et al. Immunogenic Cell Death Induction by Ionizing Radiation. Front Immunol. 2021;12:705361.
368. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med. janv 2007;13(1):54-61.
369. Fucikova J, Spisek R, Kroemer G, Galluzzi L. Calreticulin and cancer. Cell Res. janv 2021;31(1):5-16.
370. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nat Med. sept 2007;13(9):1050-9.
371. Liao Y, Liu S, Fu S, Wu J. HMGB1 in Radiotherapy: A Two Headed Signal Regulating Tumor Radiosensitivity and Immunity. OTT. 14 juill 2020;13:6859-71.
372. Martins I, Wang Y, Michaud M, Ma Y, Sukkurwala AQ, Shen S, et al. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. Cell Death Differ. janv 2014;21(1):79-91.
373. Wang Y, Martins I, Ma Y, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Autophagy-dependent ATP release from dying cells via lysosomal exocytosis. Autophagy. 25 oct 2013;9(10):1624-5.
374. Ayna G, Krysko DV, Kaczmarek A, Petrovski G, Vandenabeele P, Fésüs L. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. PLoS One. 2012;7(6):e40069.
375. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. Annu Rev Immunol. 2011;29:185-214.
376. Zhang X, Wu J, Du F, Xu H, Sun L, Chen Z, et al. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. Cell Rep. 13 févr 2014;6(3):421-30.
377. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic-GMP-AMP Is An Endogenous

Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. Science. 15 févr 2013;339(6121):10.1126/science.1229963.
378. Shang G, Zhang C, Chen ZJ, Bai XC, Zhang X. Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. Nature. mars 2019;567(7748):389-93.
379. Zhang C, Shang G, Gui X, Zhang X, Bai XC, Chen ZJ. Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1. Nature. mars 2019;567(7748):394-8.
380. Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. Sci Signal. 6 mars 2012;5(214):ra20.
381. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I Inteferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. Immunity. 1 sept 2006;25(3):349-60.
382. Abe T, Barber GN. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-κB activation through TBK1. J Virol. mai 2014;88(10):5328-41.
383. Kim J, Kim HS, Chung JH. Molecular mechanisms of mitochondrial DNA release and activation of the cGAS-STING pathway. Exp Mol Med. mars 2023;55(3):510-9.
384. Constanzo J, Faget J, Ursino C, Badie C, Pouget JP. Radiation-Induced Immunity and Toxicities: The Versatility of the cGAS-STING Pathway. Front Immunol. 2021;12:680503.
385. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. Immunity. 20 nov 2014;41(5):843-52.
386. Fang C, Mo F, Liu L, Du J, Luo M, Men K, et al. Oxidized mitochondrial DNA sensing by STING signaling promotes the antitumor effect of an irradiated immunogenic cancer cell vaccine. Cell Mol Immunol. sept 2021;18(9):2211-23.
387. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type i interferon-dependent innate and adaptive immunity. Cancer Res. 1 avr 2011;71(7):2488-96.
388. Lim JYH, Gerber SA, Murphy SP, Lord EM. Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8+ T cells. Cancer Immunol Immunother. 1 mars 2014;63(3):259-71.
389. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz Y, Diamond JM, Schneider RJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. Nat Commun. 9 juin 2017;8(1):15618.
390. Gan Y, Li X, Han S, Liang Q, Ma X, Rong P, et al. The cGAS/STING Pathway: A Novel Target for Cancer Therapy. Front Immunol. 3 janv 2022;12:795401.
391. Storozynsky Q, Hitt MM. The Impact of Radiation-Induced DNA Damage on cGAS-STING-Mediated Immune Responses to Cancer. Int J Mol Sci. 23 nov 2020;21(22):8877.
392. Liang H, Deng L, Hou Y, Meng X, Huang X, Rao E, et al. Host STING-dependent MDSC mobilization drives extrinsic radiation resistance. Nat Commun. 23 nov 2017;8(1):1736.
393. Chen B, Alvarado DM, Iticovici M, Kau NS, Park H, Parikh PJ, et al. Interferon-Induced IDO1 Mediates Radiation Resistance and Is a Therapeutic Target in Colorectal Cancer. Cancer Immunol Res. avr 2020;8(4):451-64.
394. Zheng Z, Jia S, Shao C, Shi Y. Irradiation induces cancer lung metastasis through activation of the cGAS-STING-CCL5 pathway in mesenchymal stromal cells. Cell Death Dis. 7 mai 2020;11(5):326.
395. Venkatesulu BP, Mahadevan LS, Aliru ML, Yang X, Bodd MH, Singh PK, et al. Radiation-Induced Endothelial Vascular Injury. JACC Basic Transl Sci. 28 août 2018;3(4):563-72.
396. Arnold KM, Flynn NJ, Raben A, Romak L, Yu Y, Dicker AP, et al. The Impact of Radiation

on the Tumor Microenvironment: Effect of Dose and Fractionation Schedules. Cancer Growth Metastasis. 9 mars 2018;11:1179064418761639.
397. Solesvik OV, Rofstad EK, Brustad T. Vascular changes in a human malignant melanoma xenograft following single-dose irradiation. Radiat Res. avr 1984;98(1):115-28.
398. Maeda A, Chen Y, Bu J, Mujcic H, Wouters BG, DaCosta RS. In Vivo Imaging Reveals Significant Tumor Vascular Dysfunction and Increased Tumor Hypoxia-Inducible Factor-1α Expression Induced by High Single-Dose Irradiation in a Pancreatic Tumor Model. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1 janv 2017;97(1):184-94.
399. Heissig B, Rafii S, Akiyama H, Ohki Y, Sato Y, Rafael T, et al. Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. J Exp Med. 19 sept 2005;202(6):739-50.
400. Handschel J, Prott FJ, Sunderkötter C, Metze D, Meyer U, Joos U. Irradiation induces increase of adhesion molecules and accumulation of beta2-integrin-expressing cells in humans. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1 sept 1999;45(2):475-81.
401. Prabhakarpandian B, Goetz DJ, Swerlick RA, Chen X, Kiani MF. Expression and functional significance of adhesion molecules on cultured endothelial cells in response to ionizing radiation. Microcirculation. oct 2001;8(5):355-64.
402. Piper M, Mueller AC, Karam SD. The interplay between cancer associated fibroblasts and immune cells in the context of radiation therapy. Molecular Carcinogenesis. 2020;59(7):754-65.
403. Li D, Qu C, Ning Z, Wang H, Zang K, Zhuang L, et al. Radiation promotes epithelial-to-mesenchymal transition and invasion of pancreatic cancer cell by activating carcinoma-associated fibroblasts. Am J Cancer Res. 2016;6(10):2192-206.
404. Berzaghi R, Ahktar MA, Islam A, Pedersen BD, Hellevik T, Martinez-Zubiaurre I. Fibroblast-Mediated Immunoregulation of Macrophage Function Is Maintained after Irradiation. Cancers. mai 2019;11(5):689.
405. Qin VM, Haynes NM, D'Souza C, Neeson PJ, Zhu JJ. CAR-T Plus Radiotherapy: A Promising Combination for Immunosuppressive Tumors. Front Immunol. 12 janv 2022;12:813832.
406. Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. J Exp Med. 15 mai 2006;203(5):1259-71.
407. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. Nature. 25 août 2005;436(7054):1186-90.
408. Chakraborty M, Abrams SI, Camphausen K, Liu K, Scott T, Coleman CN, et al. Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. J Immunol. 15 juin 2003;170(12):6338-47.
409. Krombach J, Hennel R, Brix N, Orth M, Schoetz U, Ernst A, et al. Priming anti-tumor immunity by radiotherapy: Dying tumor cell-derived DAMPs trigger endothelial cell activation and recruitment of myeloid cells. Oncoimmunology. 2 nov 2018;8(1):e1523097.
410. Shinde-Jadhav S, Mansure JJ, Rayes RF, Marcq G, Ayoub M, Skowronski R, et al. Role of neutrophil extracellular traps in radiation resistance of invasive bladder cancer. Nat Commun. 13 mai 2021;12(1):2776.
411. Takeshima T, Pop LM, Laine A, Iyengar P, Vitetta ES, Hannan R. Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: Potentiation with G-CSF. Proc Natl Acad Sci U S A. 4 oct 2016;113(40):11300-5.
412. Barker HE, Paget JTE, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after

radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. Nat Rev Cancer. juill 2015;15(7):409-25.
413. Wang P, Guo F, Han L, Wang X, Li J, Guo Y, et al. X-ray-Induced Changes in the Expression of Inflammation-Related Genes in Human Peripheral Blood. International Journal of Molecular Sciences. nov 2014;15(11):19516-34.
414. Meng Y, Beckett MA, Liang H, Mauceri HJ, van Rooijen N, Cohen KS, et al. Blockade of tumor necrosis factor alpha signaling in tumor-associated macrophages as a radiosensitizing strategy. Cancer Res. 15 févr 2010;70(4):1534-43.
415. Stafford JH, Hirai T, Deng L, Chernikova SB, Urata K, West BL, et al. Colony stimulating factor 1 receptor inhibition delays recurrence of glioblastoma after radiation by altering myeloid cell recruitment and polarization. Neuro Oncol. juin 2016;18(6):797-806.
416. Genard G, Lucas S, Michiels C. Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages with Anticancer Therapies: Radiotherapy versus Chemo- and Immunotherapies. Front Immunol. 2017;8:828.
417. Tsai CS, Chen FH, Wang CC, Huang HL, Jung SM, Wu CJ, et al. Macrophages From Irradiated Tumors Express Higher Levels of iNOS, Arginase-I and COX-2, and Promote Tumor Growth. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. 1 juin 2007;68(2):499-507.
418. Seifert L, Werba G, Tiwari S, Ly NNG, Nguy S, Alothman S, et al. Radiation Therapy Induces Macrophages to Suppress T-Cell Responses Against Pancreatic Tumors in Mice. Gastroenterology. 1 juin 2016;150(7):1659-1672.e5.
419. Okubo M, Kioi M, Nakashima H, Sugiura K, Mitsudo K, Aoki I, et al. M2-polarized macrophages contribute to neovasculogenesis, leading to relapse of oral cancer following radiation. Sci Rep. 8 juin 2016;6:27548.
420. Hildebrandt G, Radlingmayr A, Rosenthal S, Rothe R, Jahns J, Hindemith M, et al. Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats. International Journal of Radiation Biology. 1 déc 2003;79(12):993-1001.
421. Tsukimoto M, Homma T, Mutou Y, Kojima S. 0.5 Gy Gamma Radiation Suppresses Production of TNF-α through Up-regulation of MKP-1 in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells. rare. févr 2009;171(2):219-24.
422. Lödermann B, Wunderlich R, Frey S, Schorn C, Stangl S, Rödel F, et al. Low dose ionising radiation leads to a NF-κB dependent decreased secretion of active IL-1β by activated macrophages with a discontinuous dose-dependency. Int J Radiat Biol. oct 2012;88(10):727-34.
423. Prakash H, Klug F, Nadella V, Mazumdar V, Schmitz-Winnenthal H, Umansky L. Low doses of gamma irradiation potentially modifies immunosuppressive tumor microenvironment by retuning tumor-associated macrophages: lesson from insulinoma. Carcinogenesis. 1 mars 2016;37(3):301-13.
424. Wu Q, Allouch A, Paoletti A, Leteur C, Mirjolet C, Martins I, et al. NOX2-dependent ATM kinase activation dictates pro-inflammatory macrophage phenotype and improves effectiveness to radiation therapy. Cell Death Differ. sept 2017;24(9):1632-44.
425. Wunderlich R, Rühle PF, Deloch L, Rödel F, Fietkau R, Gaipl US, et al. Ionizing radiation reduces the capacity of activated macrophages to induce T-cell proliferation, but does not trigger dendritic cell-mediated non-targeted effects. International Journal of Radiation Biology. 18 janv 2019;95(1):33-43.
426. Parker JJ, Jones JC, Strober S, Knox SJ. Characterization of direct radiation-induced immune function and molecular signaling changes in an antigen presenting cell line. Clin

Immunol. juill 2013;148(1):44-55.
427. Lin N, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation. J Clin Invest. 3 oct 2016;126(10):3661-71.
428. Xia Q, Jia J, Hu C, Lu J, Li J, Xu H, et al. Tumor-associated macrophages promote PD-L1 expression in tumor cells by regulating PKM2 nuclear translocation in pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncogene. févr 2022;41(6):865-77.
429. Wheeler KC, Jena MK, Pradhan BS, Nayak N, Das S, Hsu CD, et al. VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. PLOS ONE. 11 janv 2018;13(1):e0191040.
430. Li Y, Rahmanian M, Widström C, Lepperdinger G, Frost GI, Heldin P. Irradiation-Induced Expression of Hyaluronan (HA) Synthase 2 and Hyaluronidase 2 Genes in Rat Lung Tissue Accompanies Active Turnover of HA and Induction of Types I and III Collagen Gene Expression. Am J Respir Cell Mol Biol. sept 2000;23(3):411-8.
431. Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Kitazawa M, Takeoka M, et al. Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. Cancer Res. 15 sept 2010;70(18):7073-83.
432. Teresa Pinto A, Laranjeiro Pinto M, Patrícia Cardoso A, Monteiro C, Teixeira Pinto M, Filipe Maia A, et al. Ionizing radiation modulates human macrophages towards a pro-inflammatory phenotype preserving their pro-invasive and pro-angiogenic capacities. Sci Rep. 6 janv 2016;6(1):18765.
433. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat Immunol. oct 2010;11(10):889-96.
434. Crittenden MR, Cottam B, Savage T, Nguyen C, Newell P, Gough MJ. Expression of NF-κB p50 in Tumor Stroma Limits the Control of Tumors by Radiation Therapy. PLOS ONE. 28 juin 2012;7(6):e39295.
435. Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress. Cell. 26 nov 2003;115(5):565-76.
436. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev. mars 2011;75(1):50-83.
437. Salojin KV, Owusu IB, Millerchip KA, Potter M, Platt KA, Oravecz T. Essential Role of MAPK Phosphatase-1 in the Negative Control of Innate Immune Responses. The Journal of Immunology. 1 févr 2006;176(3):1899-907.
438. Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Soma GI. ROS and innate immunity. Anticancer Res. mars 2009;29(3):817-21.
439. Narang H, Krishna M. Effect of nitric oxide donor and gamma irradiation on MAPK signaling in murine peritoneal macrophages. J Cell Biochem. 1 févr 2008;103(2):576-87.
440. Beach C, MacLean D, Majorova D, Arnold JN, Olcina MM. The effects of radiation therapy on the macrophage response in cancer. Front Oncol. 2022;12:1020606.
441. Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, et al. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. Sig Transduct Target Ther. 28 avr 2021;6(1):1-20.
442. Ainscow EK, Mirshamsi S, Tang T, Ashford MLJ, Rutter GA. Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K+ channels. The Journal of Physiology. 2002;544(2):429-45.
443. Dosch M, Gerber J, Jebbawi F, Beldi G. Mechanisms of ATP Release by Inflammatory

Cells. International Journal of Molecular Sciences. avr 2018;19(4):1222.
444. Homolya L, Steinberg TH, Boucher RC. Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia. J Cell Biol. 18 sept 2000;150(6):1349-60.
445. McNamara N, Khong A, McKemy D, Caterina M, Boyer J, Julius D, et al. ATP transduces signals from ASGM1, a glycolipid that functions as a bacterial receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences. 31 juill 2001;98(16):9086-91.
446. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, Walk SF, Kinchen JM, Lazarowski ER, et al. Pannexin 1 channels mediate « find-me » signal release and membrane permeability during apoptosis. Nature. 14 oct 2010;467(7317):863-7.
447. Faigle M, Seessle J, Zug S, Kasmi KCE, Eltzschig HK. ATP Release from Vascular Endothelia Occurs Across Cx43 Hemichannels and Is Attenuated during Hypoxia. PLOS ONE. 30 juill 2008;3(7):e2801.
448. Eltzschig HK, Macmanus CF, Colgan SP. Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface. Trends Cardiovasc Med. avr 2008;18(3):103-7.
449. Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, Küper N, Karcher C, Weissmüller T, et al. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. Circ Res. 10 nov 2006;99(10):1100-8.
450. Cho JH, Wool GD, Tjota MY, Gutierrez J, Mikrut K, Miller JL. Functional Assessment of Platelet Dense Granule ATP Release: Optimization Using Minute Blood Volumes. American Journal of Clinical Pathology. 1 juin 2021;155(6):863-72.
451. Wang Y, Martins I, Ma Y, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Autophagy-dependent ATP release from dying cells via lysosomal exocytosis. Autophagy. 25 oct 2013;9(10):1624-5.
452. Anderson CM, Parkinson FE. Potential signalling roles for utp and udp: sources, regulation and release of uracil nucleotides. Trends in Pharmacological Sciences. 1 oct 1997;18(10):387-92.
453. Lazarowski ER, Boucher RC. UTP as an Extracellular Signaling Molecule. Physiology. févr 2001;16(1):1-5.
454. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. Nature. mai 2014;509(7500):310-7.
455. Fredholm BB. Adenosine—a physiological or pathophysiological agent? J Mol Med. 1 mars 2014;92(3):201-6.
456. Vaisitti T, Arruga F, Guerra G, Deaglio S. Ectonucleotidases in Blood Malignancies: A Tale of Surface Markers and Therapeutic Targets. Front Immunol. 2019;10:2301.
457. Valdés R, Elferich J, Shinde U, Landfear SM. Identification of the intracellular gate for a member of the equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. J Biol Chem. 28 mars 2014;289(13):8799-809.
458. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic Signaling during Inflammation. N Engl J Med. 13 déc 2012;367(24):2322-33.
459. Burnstock G. Purine and purinergic receptors. Brain Neurosci Adv. 6 déc 2018;2:2398212818817494.
460. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. Physiological Reviews. juill 2018;98(3):1591-625.
461. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. Nat Rev Cancer. déc 2013;13(12):842-57.
462. Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi É, Hausmann R, Nicke A. Molecular and functional

properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges. Purinergic Signalling. 1 sept 2012;8(3):375-417.
463. Schmid R, Evans RJ. ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. Annu Rev Physiol. 10 févr 2019;81:43-62.
464. von Kügelgen I, Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors. Neuropharmacology. 1 mai 2016;104:50-61.
465. Erb L, Weisman GA. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal. 2012;1(6):789-803.
466. Klaver D, Thurnher M. Control of Macrophage Inflammation by P2Y Purinergic Receptors. Cells. 4 mai 2021;10(5):1098.
467. Corriden R, Insel PA. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. Sci Signal. 12 janv 2010;3(104):re1.
468. Menzies RI, Tam FW, Unwin RJ, Bailey MA. Purinergic signaling in kidney disease. Kidney International. 1 févr 2017;91(2):315-23.
469. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. Nat Rev Immunol. mars 2016;16(3):177-92.
470. Desai BN, Leitinger N. Purinergic and Calcium Signaling in Macrophage Function and Plasticity. Front Immunol. 27 nov 2014;5:580.
471. Coutinho-Silva R, Ojcius DM, Górecki DC, Persechini PM, Bisaggio RC, Mendes AN, et al. Multiple P2X and P2Y receptor subtypes in mouse J774, spleen and peritoneal macrophages. Biochemical Pharmacology. 15 févr 2005;69(4):641-55.
472. Sasaki Y, Hoshi M, Akazawa C, Nakamura Y, Tsuzuki H, Inoue K, et al. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12 in microglia in rat brain. Glia. 2003;44(3):242-50.
473. Medina CB, Ravichandran KS. Do not let death do us part: 'find-me' signals in communication between dying cells and the phagocytes. Cell Death Differ. juin 2016;23(6):979-89.
474. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature. sept 2009;461(7261):282-6.
475. Kloss L, Dollt C, Schledzewski K, Krewer A, Melchers S, Manta C, et al. ADP secreted by dying melanoma cells mediates chemotaxis and chemokine secretion of macrophages via the purinergic receptor P2Y12. Cell Death Dis. 7 oct 2019;10(10):760.
476. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, et al. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. J Neurosci. 15 mars 2001;21(6):1975-82.
477. Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, et al. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. Nat Neurosci. déc 2006;9(12):1512-9.
478. Ohsawa K, Irino Y, Nakamura Y, Akazawa C, Inoue K, Kohsaka S. Involvement of P2X4 and P2Y12 receptors in ATP-induced microglial chemotaxis. Glia. 2007;55(6):604-16.
479. Kronlage M, Song J, Sorokin L, Isfort K, Schwerdtle T, Leipziger J, et al. Autocrine Purinergic Receptor Signaling Is Essential for Macrophage Chemotaxis. Science Signaling. 27 juill 2010;3(132):ra55-ra55.
480. Isfort K, Ebert F, Bornhorst J, Sargin S, Kardakaris R, Pasparakis M, et al. Real-time Imaging Reveals That P2Y2 and P2Y12 Receptor Agonists Are Not Chemoattractants and Macrophage Chemotaxis to Complement C5a Is Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)- and

p38 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-independent * ♦. Journal of Biological Chemistry. 30 déc 2011;286(52):44776-87.
481. Marques-da-Silva C, Burnstock G, Ojcius DM, Coutinho-Silva R. Purinergic receptor agonists modulate phagocytosis and clearance of apoptotic cells in macrophages. Immunobiology. 1 janv 2011;216(1):1-11.
482. Zumerle S, Calì B, Munari F, Angioni R, Di Virgilio F, Molon B, et al. Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. Cell Reports. 2 avr 2019;27(1):1-10.e4.
483. Fang KM, Yang CS, Sun SH, Tzeng SF. Microglial phagocytosis attenuated by short-term exposure to exogenous ATP through P2X receptor action. J Neurochem. déc 2009;111(5):1225-37.
484. Gu BJ, Saunders BM, Jursik C, Wiley JS. The P2X7-nonmuscle myosin membrane complex regulates phagocytosis of nonopsonized particles and bacteria by a pathway attenuated by extracellular ATP. Blood. 25 févr 2010;115(8):1621-31.
485. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. Nature. avr 2007;446(7139):1091-5.
486. Neher JJ, Neniskyte U, Hornik T, Brown GC. Inhibition of UDP/P2Y6 purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. Glia. sept 2014;62(9):1463-75.
487. Eppell BA, Newell AM, Brown EJ. Adenosine receptors are expressed during differentiation of monocytes to macrophages in vitro. Implications for regulation of phagocytosis. J Immunol. 15 déc 1989;143(12):4141-5.
488. Belikoff BG, Hatfield S, Georgiev P, Ohta A, Lukashev D, Buras JA, et al. A2B adenosine receptor blockade enhances macrophage-mediated bacterial phagocytosis and improves polymicrobial sepsis survival in mice. J Immunol. 15 févr 2011;186(4):2444-53.
489. Baroja-Mazo A, Barberà-Cremades M, Pelegrín P. P2X7 receptor activation impairs exogenous MHC class I oligopeptides presentation in antigen presenting cells. PLoS One. 2013;8(8):e70577.
490. Toki Y, Takenouchi T, Harada H, Tanuma S ichi, Kitani H, Kojima S, et al. Extracellular ATP induces P2X7 receptor activation in mouse Kupffer cells, leading to release of IL-1β, HMGB1, and PGE2, decreased MHC class I expression and necrotic cell death. Biochem Biophys Res Commun. 20 mars 2015;458(4):771-6.
491. Figliuolo VR, Chaves SP, Santoro GF, Coutinho CMLM, Meyer-Fernandes JR, Rossi-Bergmann B, et al. Periodate-oxidized ATP modulates macrophage functions during infection with Leishmania amazonensis. Cytometry A. juill 2014;85(7):588-600.
492. Qu Y, Ramachandra L, Mohr S, Franchi L, Harding CV, Nunez G, et al. P2X7 Receptor-Stimulated Secretion of MHC Class II-Containing Exosomes Requires the ASC/NLRP3 Inflammasome but Is Independent of Caspase-1 1. The Journal of Immunology. 15 avr 2009;182(8):5052-62.
493. Ramachandra L, Qu Y, Wang Y, Lewis CJ, Cobb BA, Takatsu K, et al. Mycobacterium tuberculosis Synergizes with ATP To Induce Release of Microvesicles and Exosomes Containing Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Capable of Antigen Presentation. Infect Immun. déc 2010;78(12):5116-25.
494. Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluis C, Franco R, et al. IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. J Immunol. 15 mars 1999;162(6):3607-14.

495. Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura ALM, Persechini PM, Ojcius DM. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages*. Journal of Biological Chemistry. 2 févr 2007;282(5):2871-9.
496. Tonetti M, Sturla L, Bistolfi T, Benatti U, De Flora A. Extracellular ATP potentiates nitric oxide synthase expression induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 murine macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 30 août 1994;203(1):430-5.
497. Parvathenani LK, Tertyshnikova S, Greco CR, Roberts SB, Robertson B, Posmantur R. P2X7 Mediates Superoxide Production in Primary Microglia and Is Up-regulated in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease*. Journal of Biological Chemistry. 11 avr 2003;278(15):13309-17.
498. Pfeiffer ZA, Guerra AN, Hill LM, Gavala ML, Prabhu U, Aga M, et al. Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation. Free Radical Biology and Medicine. 15 mai 2007;42(10):1506-16.
499. Moore SF, MacKenzie AB. NADPH Oxidase NOX2 Mediates Rapid Cellular Oxidation following ATP Stimulation of Endotoxin-Primed Macrophages1. The Journal of Immunology. 1 sept 2009;183(5):3302-8.
500. Moreira-Souza ACA, Almeida-da-Silva CLC, Rangel TP, Rocha G da C, Bellio M, Zamboni DS, et al. The P2X7 Receptor Mediates Toxoplasma gondii Control in Macrophages through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. Front Immunol. 2017;8:1257.
501. Corrêa G, Marques da Silva C, de Abreu Moreira-Souza AC, Vommaro RC, Coutinho-Silva R. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of Toxoplasma gondii tachyzoites from infected macrophages. Microbes and Infection. 1 juin 2010;12(6):497-504.
502. Bidula S, Dhuna K, Helliwell R, Stokes L. Positive allosteric modulation of P2X7 promotes apoptotic cell death over lytic cell death responses in macrophages. Cell Death Dis. 25 nov 2019;10(12):1-16.
503. Sommer JA, Fisette PL, Hu Y, Denlinger LC, Guerra AN, Bertics PJ, et al. Purinergic receptor modulation of LPS-stimulated signaling events and nitric oxide release in RAW 264.7 macrophages. Journal of Endotoxin Research. 1 févr 1999;5(1-2):70-4.
504. Sperlágh B, Haskó G, Németh Z, Vizi ES. ATP released by LPS increases nitric oxideproduction in raw 264.7 macrophage cell line viaP2Z\P2X7 receptorsfn1fn1Due to circumstancesbeyond the Publishers control, this article appears withoutthe authors corrections. Neurochemistry International. 1 sept 1998;33(3):209-15.
505. Hu Y, Fisette PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, et al. Purinergic Receptor Modulation of Lipopolysaccharide Signaling and Inducible Nitric-oxide Synthase Expression in RAW 264.7 Macrophages*. Journal of Biological Chemistry. 16 oct 1998;273(42):27170-5.
506. Csóka B, Németh ZH, Szabó I, Davies DL, Varga ZV, Pálóczi J, et al. Macrophage P2X4 receptors augment bacterial killing and protect against sepsis. JCI Insight. 7 juin 2018;3(11):e99431, 99431.
507. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Chaves SP, Figliuolo VR, Meyer-Fernandes JR, Corte-Real S, et al. Infection with Leishmania amazonensis upregulates purinergic receptor expression and induces host-cell susceptibility to UTP-mediated apoptosis. Cellular Microbiology. 2011;13(9):1410-28.
508. Marques-da-Silva C, Chaves MM, Thorstenberg ML, Figliuolo VR, Vieira FS, Chaves SP, et al. Intralesional uridine-5'-triphosphate (UTP) treatment induced resistance to Leishmania

amazonensis infection by boosting Th1 immune responses and reactive oxygen species production. Purinergic Signalling. 1 juin 2018;14(2):201-11.
509. Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences. oct 1991;88(19):8485-9.
510. Griffiths RJ, Stam EJ, Downs JT, Otterness IG. ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. J Immunol. 15 mars 1995;154(6):2821-8.
511. Sanz JM, Di Virgilio F. Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. J Immunol. 1 mai 2000;164(9):4893-8.
512. Perregaux D, Gabel CA. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. J Biol Chem. 27 mai 1994;269(21):15195-203.
513. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. Trends in Biochemical Sciences. 1 déc 2016;41(12):1012-21.
514. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ. sept 2007;14(9):1583-9.
515. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. J Exp Med. 3 févr 1997;185(3):579-82.
516. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, et al. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. J Immunol. 1 août 1997;159(3):1451-8.
517. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. Trends Pharmacol Sci. sept 2007;28(9):465-72.
518. Le Feuvre RA, Brough D, Iwakura Y, Takeda K, Rothwell NJ. Priming of Macrophages with Lipopolysaccharide Potentiates P2X7-mediated Cell Death via a Caspase-1-dependent Mechanism, Independently of Cytokine Production*. Journal of Biological Chemistry. 1 févr 2002;277(5):3210-8.
519. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. Nature. déc 2001;414(6866):916-20.
520. Elson G, Eisenberg M, Garg C, Outram S, Ferrante CJ, Hasko G, et al. Induction of murine adenosine A2A receptor expression by LPS: analysis of the 5′ upstream promoter. Genes Immun. avr 2013;14(3):147-53.
521. He X, Hu JL, Li J, Zhao L, Zhang Y, Zeng YJ, et al. A feedback loop in PPARγ–adenosine A2A receptor signaling inhibits inflammation and attenuates lung damages in a mouse model of LPS-induced acute lung injury. Cellular Signalling. 1 sept 2013;25(9):1913-23.
522. Duró E, Pallai A, Köröskényi K, Sarang Z, Szondy Z. Adenosine A3 receptors negatively regulate the engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation. Immunology Letters. 1 déc 2014;162(2, Part B):292-301.
523. Merz J, Nettesheim A, von Garlen S, Albrecht P, Saller BS, Engelmann J, et al. Pro- and anti-inflammatory macrophages express a sub-type specific purinergic receptor profile. Purinergic Signal. sept 2021;17(3):481-92.
524. Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Németh ZH, Pacher P, Murray PJ, et al. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. FASEB J. janv 2012;26(1):376-86.
525. Koscsó B, Csóka B, Kókai E, Németh ZH, Pacher P, Virág L, et al. Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages. J Leukoc Biol. déc 2013;94(6):1309-15.

526. Hamidzadeh K, Mosser DM. Purinergic Signaling to Terminate TLR Responses in Macrophages. Front Immunol. 2016;7:74.
527. Crean D, Cummins EP, Bahar B, Mohan H, McMorrow JP, Murphy EP. Adenosine Modulates NR4A Orphan Nuclear Receptors To Attenuate Hyperinflammatory Responses in Monocytic Cells. The Journal of Immunology. 15 août 2015;195(4):1436-48.
528. Sun Y, Duan Y, Eisenstein AS, Hu W, Quintana A, Lam WK, et al. A novel mechanism of control of NFκB activation and inflammation involving A2B adenosine receptors. J Cell Sci. 1 oct 2012;125(19):4507-17.
529. Haskó G, Pacher P. Regulation of Macrophage Function by Adenosine. Arterioscler Thromb Vasc Biol. avr 2012;32(4):865-9.
530. Moore CS, Ase AR, Kinsara A, Rao VTS, Michell-Robinson M, Leong SY, et al. P2Y12 expression and function in alternatively activated human microglia. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 19 mars 2015;2(2):e80.
531. Zabala A, Vazquez-Villoldo N, Rissiek B, Gejo J, Martin A, Palomino A, et al. P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis. EMBO Mol Med. août 2018;10(8):e8743.
532. Sakaki H, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S. Autocrine Regulation of Macrophage Activation via Exocytosis of ATP and Activation of P2Y11 Receptor. PLOS ONE. 5 avr 2013;8(4):e59778.
533. Gruenbacher G, Gander H, Dobler G, Rahm A, Klaver D, Thurnher M. The human G protein-coupled ATP receptor P2Y11 is a target for anti-inflammatory strategies. Br J Pharmacol. avr 2021;178(7):1541-55.
534. Gruenbacher G, Gander H, Rahm A, Dobler G, Drasche A, Troppmair J, et al. The Human G Protein-Coupled ATP Receptor P2Y11 Is Associated With IL-10 Driven Macrophage Differentiation. Front Immunol. 2019;10:1870.
535. Klaver D, Gander H, Dobler G, Rahm A, Thurnher M. The P2Y11 receptor of human M2 macrophages activates canonical and IL-1 receptor signaling to translate the extracellular danger signal ATP into anti-inflammatory and pro-angiogenic responses. Cell Mol Life Sci. 15 sept 2022;79(10):519.
536. Cowen DS, Lazarus HM, Shurin SB, Stoll SE, Dubyak GR. Extracellular adenosine triphosphate activates calcium mobilization in human phagocytic leukocytes and neutrophil/monocyte progenitor cells. J Clin Invest. mai 1989;83(5):1651-60.
537. Cowen DS, Berger M, Nuttle L, Dubyak GR. Chronic treatment with P2-purinergic receptor agonists induces phenotypic modulation of the HL-60 and U937 human myelogenous leukemia cell lines. J Leukoc Biol. août 1991;50(2):109-22.
538. Santiago-Pérez LI, Flores RV, Santos-Berríos C, Chorna NE, Krugh B, Garrad RC, et al. P2Y2 nucleotide receptor signaling in human monocytic cells: Activation, desensitization and coupling to mitogen-activated protein kinases. Journal of Cellular Physiology. 2001;187(2):196-208.
539. Dybbro E, Biswas A, Narayanan S, Desai M, Thevananther S. P2Y2 purinergic signaling potentiates TLR4-mediated NF-kB activation and pro-inflammatory polarization of macrophages.
540. Dybbro E, Narayanan S, Thevananther S. TLR4-mediated activation of pro-inflammatory cell signaling is attenuated in P2Y2-/- bone marrow-derived macrophages.
541. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. Journal of Cell Biology. 8 févr 2016;212(4):379-87.
542. Tao T, Chen X, Zhou Y, Zheng Q, Gao S, Wang J, et al. Continued P2X7 activation leads

to mitochondrial fission and compromising microglial phagocytosis after subarachnoid haemorrhage. J Neurochem. déc 2022;163(5):419-37.
543. Di Virgilio F, Sarti AC, Falzoni S, De Marchi E, Adinolfi E. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer. oct 2018;18(10):601-18.
544. Di Virgilio F, Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. Oncogene. janv 2017;36(3):293-303.
545. Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S. Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. J Biol Chem. 4 juin 2010;285(23):17406-16.
546. Campos-Contreras A del R, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. Cells. 3 juill 2020;9(7):1612.
547. Allard B, Allard D, Buisseret L, Stagg J. The adenosine pathway in immuno-oncology. Nat Rev Clin Oncol. oct 2020;17(10):611-29.
548. Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. J Mol Med. 1 févr 2013;91(2):165-72.
549. Poth JM, Brodsky K, Ehrentraut H, Grenz A, Eltzschig HK. Transcriptional control of adenosine signaling by hypoxia-inducible transcription factors during ischemic or inflammatory disease. J Mol Med (Berl). févr 2013;91(2):183-93.
550. Sitkovsky MV, Hatfield S, Abbott R, Belikoff B, Lukashev D, Ohta A. Hostile, hypoxia-A2-adenosinergic tumor biology as the next barrier to overcome for tumor immunologists. Cancer Immunol Res. juill 2014;2(7):598-605.
551. Volonté C, D'Ambrosi N. Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. FEBS J. janv 2009;276(2):318-29.
552. Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, Guo X, et al. Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 30 juin 2009;106(26):10684-9.
553. Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK, Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. FASEB J. nov 2006;20(13):2242-50.
554. Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. Purinergic Signalling. 1 déc 2013;9(4):491-540.
555. Salvestrini V, Orecchioni S, Talarico G, Reggiani F, Mazzetti C, Bertolini F, et al. Extracellular ATP induces apoptosis through P2X7R activation in acute myeloid leukemia cells but not in normal hematopoietic stem cells. Oncotarget. 24 janv 2017;8(4):5895-908.
556. Kepp O, Loos F, Liu P, Kroemer G. Extracellular nucleosides and nucleotides as immunomodulators. Immunol Rev. nov 2017;280(1):83-92.
557. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MKK, et al. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 29 août 2006;103(35):13132-7.
558. Young A, Ngiow SF, Gao Y, Patch AM, Barkauskas DS, Messaoudene M, et al. A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment. Cancer Res. 15 févr 2018;78(4):1003-16.
559. Mittal D, Young A, Stannard K, Yong M, Teng MWL, Allard B, et al. Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. Cancer Res. 15 juill 2014;74(14):3652-8.
560. Leone RD, Sun IM, Oh MH, Sun IH, Wen J, Englert J, et al. Inhibition of the adenosine

A2a receptor modulates expression of T cell coinhibitory receptors and improves effector function for enhanced checkpoint blockade and ACT in murine cancer models. Cancer Immunol Immunother. août 2018;67(8):1271-84.
561. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. Blood. 1 sept 2008;112(5):1822-31.
562. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. Front Immunol. 2012;3:190.
563. Kaji W, Tanaka S, Tsukimoto M, Kojima S. Adenosine A(2B) receptor antagonist PSB603 suppresses tumor growth and metastasis by inhibiting induction of regulatory T cells. J Toxicol Sci. avr 2014;39(2):191-8.
564. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. Nat Med. oct 2009;15(10):1170-8.
565. Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, Campesato LFI, Filho AZ, Moreira JCF, et al. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. PLoS One. 2012;7(2):e31205.
566. Feng L li, Cai Y qing, Zhu M chen, Xing L jie, Wang X. The yin and yang functions of extracellular ATP and adenosine in tumor immunity. Cancer Cell Int. 7 avr 2020;20(1):110.
567. Chekeni FB, Ravichandran KS. The role of nucleotides in apoptotic cell clearance: implications for disease pathogenesis. J Mol Med (Berl). janv 2011;89(1):13-22.
568. Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Németh ZH, Pacher P, Murray PJ, et al. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. FASEB J. janv 2012;26(1):376-86.
569. Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. Curr Opin Pharmacol. août 2016;29:7-16.
570. Cekic C, Day YJ, Sag D, Linden J. Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. Cancer Res. 15 déc 2014;74(24):7250-9.
571. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. Immunol Rev. mars 2017;276(1):121-44.
572. d'Almeida SM, Kauffenstein G, Roy C, Basset L, Papargyris L, Henrion D, et al. The ecto-ATPDase CD39 is involved in the acquisition of the immunoregulatory phenotype by M-CSF-macrophages and ovarian cancer tumor-associated macrophages: Regulatory role of IL-27. Oncoimmunology. juill 2016;5(7):e1178025.
573. Perrot I, Michaud HA, Giraudon-Paoli M, Augier S, Docquier A, Gros L, et al. Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies. Cell Rep. 21 mai 2019;27(8):2411-2425.e9.
574. Li XY, Moesta AK, Xiao C, Nakamura K, Casey M, Zhang H, et al. Targeting CD39 in Cancer Reveals an Extracellular ATP- and Inflammasome-Driven Tumor Immunity. Cancer Discov. déc 2019;9(12):1754-73.
575. Janho dit Hreich S, Benzaquen J, Hofman P, Vouret-Craviari V. To inhibit or to boost the ATP/P2RX7 pathway to fight cancer—that is the question. Purinergic Signalling. 1 déc 2021;17(4):619-31.
576. Adinolfi E, Capece M, Franceschini A, Falzoni S, Giuliani AL, Rotondo A, et al. Accelerated tumor progression in mice lacking the ATP receptor P2X7. Cancer Res. 15 févr

2015;75(4):635-44.
577. Janho dit Hreich S, Hofman P, Vouret-Craviari V. The Role of IL-18 in P2RX7-Mediated Antitumor Immunity. International Journal of Molecular Sciences. janv 2023;24(11):9235.
578. Douguet L, Janho dit Hreich S, Benzaquen J, Seguin L, Juhel T, Dezitter X, et al. A small-molecule P2RX7 activator promotes anti-tumor immune responses and sensitizes lung tumor to immunotherapy. Nat Commun. 28 janv 2021;12(1):653.
579. Pavlović N, Kopsida M, Gerwins P, Heindryckx F. Inhibiting P2Y12 in Macrophages Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Promotes an Anti-Tumoral Phenotype. Int J Mol Sci. 31 oct 2020;21(21):8177.
580. Yoshino H, Kashiwakura I. Involvement of reactive oxygen species in ionizing radiation–induced upregulation of cell surface Toll-like receptor 2 and 4 expression in human monocytic cells. J Radiat Res. sept 2017;58(5):626-35.
581. Gao Z, Li Y, Wang F, Huang T, Fan K, Zhang Y, et al. Mitochondrial dynamics controls anti-tumour innate immunity by regulating CHIP-IRF1 axis stability. Nat Commun. 27 nov 2017;8(1):1805.
582. Ishihara T, Ban-Ishihara R, Maeda M, Matsunaga Y, Ichimura A, Kyogoku S, et al. Dynamics of Mitochondrial DNA Nucleoids Regulated by Mitochondrial Fission Is Essential for Maintenance of Homogeneously Active Mitochondria during Neonatal Heart Development. Molecular and Cellular Biology. 1 janv 2015;35(1):211-23.
583. Ban-Ishihara R, Ishihara T, Sasaki N, Mihara K, Ishihara N. Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. Proceedings of the National Academy of Sciences. 16 juill 2013;110(29):11863-8.
584. Cao K, Riley JS, Heilig R, Montes-Gómez AE, Vringer E, Berthenet K, et al. Mitochondrial dynamics regulate genome stability via control of caspase-dependent DNA damage. Developmental Cell. 23 mai 2022;57(10):1211-1225.e6.
585. Li Y, Chen H, Yang Q, Wan L, Zhao J, Wu Y, et al. Increased Drp1 promotes autophagy and ESCC progression by mtDNA stress mediated cGAS-STING pathway. J Exp Clin Cancer Res. 24 févr 2022;41:76.
586. Bao D, Zhao J, Zhou X, Yang Q, Chen Y, Zhu J, et al. Mitochondrial fission-induced mtDNA stress promotes tumor-associated macrophage infiltration and HCC progression. Oncogene. juin 2019;38(25):5007-20.
587. Zecchini V, Paupe V, Herranz-Montoya I, Janssen J, Wortel IMN, Morris JL, et al. Fumarate induces vesicular release of mtDNA to drive innate immunity. Nature. mars 2023;615(7952):499-506.
588. Hooftman A, Peace CG, Ryan DG, Day EA, Yang M, McGettrick AF, et al. Macrophage fumarate hydratase restrains mtRNA-mediated interferon production. Nature. mars 2023;615(7952):490-8.
589. He B, Yu H, Liu S, Wan H, Fu S, Liu S, et al. Mitochondrial cristae architecture protects against mtDNA release and inflammation. Cell Rep. 6 déc 2022;41(10):111774.
590. Cao DJ, Schiattarella GG, Villalobos E, Jiang N, May HI, Li T, et al. Cytosolic DNA Sensing Promotes Macrophage Transformation and Governs Myocardial Ischemic Injury. Circulation. 12 juin 2018;137(24):2613-34.
591. Lam KC, Araya RE, Huang A, Chen Q, Modica MD, Rodrigues RR, et al. Microbiota triggers STING-type I IFN-dependent monocyte reprogramming of the tumor microenvironment. Cell. 14 oct 2021;184(21):5338-5356.e21.
592. Gomes MTR, Guimarães ES, Marinho FV, Macedo I, Aguiar ERGR, Barber GN, et al. STING

regulates metabolic reprogramming in macrophages via HIF-1α during Brucella infection. PLOS Pathogens. 14 mai 2021;17(5):e1009597.
593. Wang X, Rao H, Zhao J, Wee A, Li X, Fei R, et al. STING expression in monocyte-derived macrophages is associated with the progression of liver inflammation and fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Lab Invest. avr 2020;100(4):542-52.
594. de la Rosa G, Gómez AI, Baños MC, Pelegrín P. Signaling Through Purinergic Receptor P2Y2 Enhances Macrophage IL-1β Production. Int J Mol Sci. 30 juin 2020;21(13):4686.
595. Eun SY, Seo J, Park SW, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. LPS potentiates nucleotide-induced inflammatory gene expression in macrophages via the upregulation of P2Y2 receptor. Int Immunopharmacol. févr 2014;18(2):270-6.
596. Merz J, Nettesheim A, von Garlen S, Albrecht P, Saller BS, Engelmann J, et al. Pro- and anti-inflammatory macrophages express a sub-type specific purinergic receptor profile. Purinergic Signalling. 1 sept 2021;17(3):481-92.
597. Paoletti A, Allouch A, Caillet M, Saïdi H, Subra F, Nardacci R, et al. HIV-1 Envelope Overcomes NLRP3-Mediated Inhibition of F-Actin Polymerization for Viral Entry. Cell Reports. 24 sept 2019;28(13):3381-3394.e7.
598. Gu H, Deng W, Zhang Y, Chang Y, Shelat VG, Tsuchida K, et al. NLRP3 activation in tumor-associated macrophages enhances lung metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Transl Lung Cancer Res. mai 2022;11(5):858-68.
599. Daley D, Mani VR, Mohan N, Akkad N, Pandian GSDB, Savadkar S, et al. NLRP3 signaling drives macrophage-induced adaptive immune suppression in pancreatic carcinoma. Journal of Experimental Medicine. 25 avr 2017;214(6):1711-24.
600. Chen L, Wan SC, Mao L, Huang CF, Bu LL, Sun ZJ. NLRP3 in tumor-associated macrophages predicts a poor prognosis and promotes tumor growth in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Immunol Immunother. 1 juin 2023;72(6):1647-60.
601. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. J Immunol. 15 juill 2009;183(2):787-91.
602. Wang S, Lin Y, Yuan X, Li F, Guo L, Wu B. REV-ERBα integrates colon clock with experimental colitis through regulation of NF-κB/NLRP3 axis. Nat Commun. 12 oct 2018;9(1):4246.
603. Huai W, Zhao R, Song H, Zhao J, Zhang L, Zhang L, et al. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates NLRP3 inflammasome activity by inhibiting NLRP3 transcription. Nat Commun. 20 août 2014;5:4738.
604. Chen D, Xiong XQ, Zang YH, Tong Y, Zhou B, Chen Q, et al. BCL6 attenuates renal inflammation via negative regulation of NLRP3 transcription. Cell Death Dis. 26 oct 2017;8(10):e3156.
605. Zhu L, Meng Q, Liang S, Ma Y, Li R, Li G, et al. The transcription factor GFI1 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. FEBS Lett. 28 nov 2014;588(23):4513-9.
606. Meziani L, Gerbé de Thoré M, Clémenson C, Liu W, Laurent PA, Mondini M, et al. Optimal dosing regimen of CD73 blockade improves tumor response to radiotherapy through iCOS downregulation. J Immunother Cancer. juin 2023;11(6):e006846.
607. Bao X, Xie L. Targeting purinergic pathway to enhance radiotherapy-induced immunogenic cancer cell death. J Exp Clin Cancer Res. 15 juill 2022;41(1):222.
608. Azizi E, Carr AJ, Plitas G, Cornish AE, Konopacki C, Prabhakaran S, et al. Single-Cell Map

of Diverse Immune Phenotypes in the Breast Tumor Microenvironment. Cell. 23 août 2018;174(5):1293-1308.e36.

ANNEXES

ANNEXE 1 : P2Y2 agonists impair NLRP3-dependent SARS-CoV-2 replication and lung inflammation

P2Y2 agonists impair NLRP3-dependent SARS-CoV-2 replication and lung inflammation

Emie Gutierrez-Mateyron[1,2], Aurélia Deva Nathan[1,2], Déborah Lécuyer[1,2], Désirée Tannous[1,2,3], Audrey Paoletti[1,2,4-6], Frédéric Subra[7], Vanessa Petit[8], Clémence Richetta[4], Lydia Meziani[1,2], Ali Mostefa-Kara[1,2], Romain Marlin[4], Pauline Maisonnasse[4], Julia Delahousse[1,2], Juliette Pascaud[5,6], Eric Deutsch[1,2], Eric Deprez[7], Marie Naigeon[2,9,10], Nathalie Chaput[9-11], Angelo Paci[1,2,10,12], Véronique Saada[12], David Ghez[1,13], Isabelle Couillin[14], Xavier Mariette[4-6], Awatef Allouch[1,2], Olivier Delelis[7], Roger Le Grand[4] and Jean-Luc Perfettini[1,2*]

[1] Université Paris-Saclay, Inserm UMR1030, Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, Villejuif, 94805, France;

[2] Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

[3] NH TherAguix SAS, Meylan, 38240, France;

[4] Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-immune, Hematological and Bacterial diseases (IMVA-HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses, 92265, France;

[5] Assistance Publique, Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, 94270, France;

[6] Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, 94270, France;

[7] Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS UMR 8113, IDA FR3242, Laboratory of Biology and Applied Pharmacology (LBPA), Gif-sur-Yvette, 91190, France;

[8] Université Paris-Saclay, Inserm U1274, CEA, Genetic Stability, Stem Cells and Radiation, Le Kremlin Bicêtre and Fontenay aux roses, 92260, France;

[9] Université Paris-Saclay, Inserm, CNRS, Analyse moléculaire, modélisation et imagerie de la maladie cancéreuse, Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie, Villejuif, 94805, France;

[10] Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, 92296, France;

[11] Université Paris-Saclay, Gustave Roussy Cancer Center, CNRS, Stabilité génétique et oncogenèse, Villejuif, 94805, France;

[12] Gustave Roussy Cancer Center, Department of Biology and Pathology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

[13] Gustave Roussy Cancer Center, Department of Hematology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, 94805, France;

[14] University of Orleans and CNRS, INEM-UMR7355, Orleans, France.

*Correspondence to: **Dr. Jean-Luc PERFETTINI**
Cell death, Immunity and Therapeutic Innovation team
Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, Inserm UMR1030
Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Pavillon de Recherche 1
114, rue Edouard Vaillant
94805 Villejuif, France
Tel. 33-1-42 11 54 24
Fax 33-1-42 11 52 36
e-mail: jean-luc.perfettini@gustaveroussy.fr

Abstract

Functional interaction between the purinergic receptor P2Y2 and the nucleotide-binding oligomerization (NOD)-like receptor protein 3 (NLRP3) was recently described in macrophages, however the impact of P2Y2 on NLRP3 inflammasome activation and lung inflammation-associated pathogenesis remains unexplored. Here, we report that the purinergic receptor P2Y2 acts as an endogenous repressor of NLRP3 inflammasome activation. P2Y2-/- mice exhibit an increase of plasma IL-1β concentration and pyroptotic cell death of lung macrophages. These results were confirmed in vitro with human macrophages inactivated for P2Y2. Inversely, P2Y2 activation with agonists impair the secretion of IL-1β through the inhibition of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) oligomerization, thus highlighting that P2Y2 negatively regulates NLRP3 inflammasome assembly. To assess the potential of P2Y2 activation for the treatment of lung diseases triggered by excessive NLRP3 inflammasome activation, we first analysed the biological effects of P2Y2 agonists on the replication of SARS-CoV-2, which depends on the activation of NLRP3 inflammasome. Surprisingly, P2Y2 agonists impair the replication of SARS-CoV-2, and inversely, a pharmacological inhibitor of P2Y2 (Kaempferol) stimulates the viral replication, thus revealing that P2Y2 act as a host restriction factor for SARS-CoV-2. Furthermore, the P2Y2 agonist Diquafosol also protects mice from bleomycin-induced lung inflammation and injury, which are triggered by NLRP3 inflammasome activation. Altogether, our results identify P2Y2 as a druggable endogenous repressor of NLRP3 inflammasome activation that offers novel opportunities for treatment of NLRP3-related pulmonary inflammatory diseases such as acute lung injury (ALI), acute respiratory distress syndrome (ARDS) and coronavirus disease 2019 (COVID-19).

Character summary

NLRP3 inflammasome activation is involved in several lung inflammatory diseases. P2Y2 agonists abrogate NLRP3-dependent SARS-CoV-2 replication and lung inflammation, making P2Y2 agonists candidates for ALI or COVID-19 treatment.

Introduction

Inflammasomes are composed of cytosolic pathogen pattern receptors (PPRs) that sense intracellular pathogen-associated molecular-patterns (PAMPs) or damage-associated molecular-patterns (DAMPs), such as pathogen-derived nucleic acids, lipopolysaccharide (LPS), adenosine triphosphate (ATP) or uric acid, in response to microbial infection or cellular stress. Upon recognition of ligands, cytosolic sensors such as NOD-like receptors (NLRs), retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs), pyrin or absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors (ALRs) oligomerize with ASC to form a large protein complex also known as ASC speck. ASC speck then recruits the pro-caspase-1 to form multimeric protein complex that promotes the proteolytic activation of caspase-1 and subsequently, drives the maturation of interleukins 1β (IL-1β) and 18 (IL-18), and the induction of pyroptosis [1, 2]. The NLRP3 inflammasome, which can be activated by a wide variety of stimuli, requires the assembly of NLRP3 with ASC and pro-caspase-1 [3]. NLRP3 expression and functions, which are critical to numerous physiological processes, including innate immune response and tissue homeostasis [4], are tightly regulated by multiple transcriptional and post-transcriptional modifications (including ubiquitinylation, phosphorylation and sumoylation) [3]. Nevertheless, excessive NLRP3 inflammasome activation or dysregulation has been detected and involved in numerous human respiratory disorders including chronic obstructive pulmonary disease (COPD), idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), ALI/ARDS and COVID-19 [5, 6]. Considering the importance of identifying novel NLRP3 inflammasome inhibitors for the treatment of lung inflammatory diseases, a better understanding of cellular and molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation is under intense investigations.

P2 purinergic receptors (P2Rs) are ubiquitously expressed plasma membrane danger receptors that ligate extracellular nucleotides such as adenosine triphosphate (ATP) or uridine triphosphate (UTP) [7]. These receptors, which are divided into two subtypes, the ionotropic P2X purinergic receptors and the metabotropic G protein-coupled-P2Y purinergic receptors, regulate multiple physiological and pathophysiological processes, ranging from neurotransmission to immune response and from inflammation to pathogen infection and cancer development [8-10]. P2X and P2Y subtypes consist of 7 (P2X1 to P2X7) and 8 (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 and P2Y14) receptors, respectively [7]. A wide variety of cellular functions are controlled by P2Rs such as migration, maturation, phagocytosis, antigen presentation, inflammatory cytokine secretion and cell death [11]. Overlaps between cellular functions of P2Rs and those regulated by NLRP3 infammasome have been identified and characterized. Upon binding of extracellular ATP, P2X7 purinergic receptor may interact with NLRP3 protein [12] and acts upstream NLRP3 inflammasome signaling pathways [1]. P2X7-dependent NLRP3 inflammasome activation is a key step in the regulation of innate immune response against infection and diseases [1, 13]. Nevertheless, several human diseases in whose P2X7 dictates NLRP3 inflammasome activation have been reported including age-related macular degeneration [14], uveitis [14], diabetes [15], bacterial infection [16] and ALI/ARDS [17, 18]. We recently revealed that in addition to the stimulation of hyperinflammation, NLRP3 inflammasome supports SARS-

CoV-2 replication [16]. Interestingly, P2X7 was identified as a driver of NLRP3 inflammasome activation during SARS-CoV-2 replication [16]. The purinergic receptor P2X4, whose functional interactions with P2X7 were reported [19], was proposed as positive modulators of NLRP3-dependent release of IL-1β and IL-18 [20]. The metabotropic P2Y2 purinergic receptor, which was initially involved in cystic fibrosis [21] and migration of neutrophils [22], was recently involved in the entry of HIV-1 into host cells [8]. A constitutive interaction between P2Y2 and NLRP3, which was initially reported in macrophages [9], was found up-regulated during the early steps of HIV-1 infection and involved in the control of host cell permissiveness [9], thus revealing an unsuspected functional link between P2Y2 and NLRP3 during macrophage activation and infection. To further characterize the functional interaction between P2Y2 and NLRP3, we first studied effect of P2Y2 inactivation on macrophage functions including IL1-β secretion and pyroptotic death using knockout mice, and investigated molecular regulatory mechanisms *in vitro*. We then determined biological effects of P2Y2 inactivation or activation on NLRP3 inflammasome activation in response to inflammatory stimulation or SARS-COV-2 infection *in vitro*, and on bleomycin-induced inflammation and lung injury *in vivo*.

Material and methods

Additional details can be found in supplementary material.

P2Y2 agonists and chemical compounds

Uridine 5'-triphosphate (UTP) (#U6625), Kaempferol (#K0133), Lipopolysaccharides (LPS) (#L2880), Adenosine 5'-triphosphate (ATP) (#A2383) were purchased from Sigma-Aldrich. Diquafosol (#HY-B0606) and Denufosol (#ND45968) were from MedChemExpress and Biosynth Carbosynth, respectively. Phorbol myristate acetate (PMA) (#tlrl-pma) and Nigericin (#tlrl-nig-5) were from Invivogen. 4-Thio-UTP (#31556-28-2) was from BOC Sciences and recombinant human interferon gamma (IFNγ) was from R&D systems (#285- IF).

Cell lines and primary cells

Monocyte THP1 cells were obtained from ATCC (#TIB2002) and maintained in RPMI-1640- Glutamax medium (Gibco, Life Technologies, UK) supplemented with 10% heat inactivated (HI) foetal bovine serum (FBS) (Eurobio, France) and 100 UI penicillin/streptomycin (P/S) (Gibco, Life Technologies, United Kingdom). THP1 macrophages were obtained after incubation for 24 hours with 320 nM PMA, as previously described [23], with the exception of LDH release assay where THP1 macrophages were obtained 3 days after incubation of THP1 monocytes with 100 nM PMA for 3 hours. African green monkey kidney Vero E6 cells were obtained from ATCC (#CRL-1587), ACE2-overexpressing A549 (ACE2-A549) cells were obtained from Dr. Olivier Schwartz (Institut Pasteur, France), ACE2 and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing A549 (ACE2-TMPRSS2-A549) cells were from Invivogen (#a549-hace2tpsa). All cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) with 10% HI FBS and 100 UI P/S at 37°C. Caco-2 cells were obtained from Pr. Guido Kroemer (Gustave Roussy, France) and cultured in EMEM (30-2003, ATCC) supplemented with 20% HI FBS and 100 UI P/S at 37°C. All cell lines used were mycoplasma-free. Human Monocytes Derived Macrophages (hMDMs) were generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from buffy coats of healthy donors from the French blood bank (Établissement Français du Sang (EFS)), after approval of EFS ethical committee (convention N°14EFS003) in agreement with French law and after obtaining a written informed consent for each donor. As previously described [24], monocytes were separated from PBMCs by adherence to the plastic and cultured in hydrophobic Teflon dishes (#94.6077.305, Lumox) in RPMI 1640 medium supplemented with 200 mM L- glutamine, 100 UI P/S, 10 mM HEPES, 10 mM sodium pyruvate, 50 µM β-mercaptoethanol, 1% minimum essential medium vitamins, 1% non-essential amino acids (all from Gibco) and 20% HI human AB serum (hABS) (#H3667, Sigma). For treatment with Kaempferol or P2Y2 depletion, MDMs were harvested and cultivated in supplemented RPMI 1640 medium containing 10% of HI FBS. Mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were obtained from femurs of 5 to 6-week-old C57BL/6 JRj mice (JANVIER Labs, France) after flushing with cold phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco) containing 5% FBS and filtration through a 70-µm strainer. After 5 minutes of centrifugation at 4°C, supernatant was discarded and cells were

cultured in RPMI-1640-Glutamax medium (Gibco) supplemented with 10% HI FBS, 100 UI P/S and 20 ng/mL recombinant mouse M-CSF (BioLegend, US) during 7 days. Primary salivary gland epithelial cells were obtained as previously described [16] and were plated at the concentration of 100 000 cells per well in 48-well plates that were pre-treated with collagen for 1 hour at 37°C.

Samples from *P2y2*$^{+/+}$ and *P2y2*$^{-/-}$ mice

Two weeks old P2y2$^{+/+}$ and P2y2$^{-/-}$ transgenic mice were obtained from Dr. Isabelle Couillin (INEM-UMR7355, Orleans, France) and sacrificed upon arrival following the Federation of European Laboratory Animal Science Association guidelines and in accordance with the Ethical Committee of the Gustave Roussy Cancer Campus (CEE A26) (Villejuif, France). After sacrifice, plasmatic serum was stored at -80°C and lung biopsies were either fixed or digested for biological analysis as previously described [25].

In vitro infection with SARS-CoV-2

Vero E6 cells, ACE2-A549 and Caco-2 cells were infected during indicated times with SARS-CoV-2 (BetaCoV/France/IDF0372/2020) at multiplicity of infection (MOI) from 1 to 2 for cytopathogenic analysis, from 0.1 to 0.2 for WB experiments, quantitative PCR experiments and immunofluorescence (IF) experiments on Vero E6 cells and at MOI 1 for IF experiments. Viral infections were performed in absence or in presence of 100 µM Diquafosol, Denufosol, 500 µM UTP or 100 µM Kaempferol, unless stated otherwise. As previously published [16], ACE2-TMPRSS2-A549, ACE2-A549 and Vero E6 cells were also infected during 4 hours with HIV-1NL4-3ΔEnv particles (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-LV) at MOI 0.1 during 4 hours for WB experiments. Virus neutralization was achieved using convalescent COVID-19 serum collected, as previously described [16]. Primary salivary gland epithelial cells were infected with SARS-CoV-2 at MOI of 0.5 for 48 hours in presence of 100 µM Kaempferol. Viral RdRp RNA was then analyzed using quantitative RT-PCR.

Bleomycin lung injuries

Female C57BL/6J mice aged 8 to 10 weeks (from JANVIER Labs (France)) were anesthetized with 2% isoflurane and instilled into the trachea with 50 UI bleomycin (Gustave Roussy Institute, France). Diquafosol (# HY-B0606, MedChemExpress) (300 µg in 100 µL/mouse) was intraperitoneally administrated 3 days before and after intratracheal instillation of bleomycin, and then, Diquafosol was injected every 3 days until day 21. Mice were randomized into 4 experimental groups: control mice, Diquafosol-treated mice, bleomycin-treated mice, and mice treated with bleomycin and Diquafosol. Lung injury was evaluated by determining lung density through computed tomography imaging. Lung immune infiltrate was analysed using immunohistochemistry (HES staining) and flow cytometry. Mice were sacrificed after CT imaging.

Computed tomography imaging

Twenty-one days after intratracheal instillation of bleomycin, mice were anesthetized with 2% isoflurane and computed tomography analysis of lung was performed using IVIS® SpectrumCT preclinical in vivo imaging system and Living Image (PerkinElmer) software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad). Statistical tests and calculated p values (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$, and ****$p < 0.0001$) are indicated in each figure and corresponding figure legend.

Results

The purinergic receptor P2Y2 is an endogenous repressor of inflammasome activation.
To study effects of P2Y2 inactivation on macrophage functions, we first assessed basal expression levels of IL-1β in P2y2$^{-/-}$ and P2y2$^{+/+}$ mice. Interestingly, the baseline plasma levels of IL-1β in P2y2$^{-/-}$ mice were higher than in wild type controls (Figure 1a), suggesting that P2Y2 acts to suppress production of IL-1β. In addition, P2y2$^{-/-}$ mice exhibited a significant reduction in the frequency of interstitial macrophages carrying signs of proinflammatory activation (Gr1^{-} CD11b^{+}CD11c^{+}CD40^{+}) (Figure 1b, 1c and supplementary Figure S1). The vast majority of residual P2y2$^{-/-}$ lung CD40^{+} macrophages contained cleaved caspase-1 and exhibited nuclear DNA fragmentation (as revealed by the TUNEL assay) (Figure 1d-1g), suggesting that the proinflammatory P2y2$^{-/-}$ interstitial macrophages were eliminated through pyroptosis. We then investigated the ability of human macrophages to release IL-1β upon treatment or not with lipopolysaccharide (LPS) and adenosine triphosphate (ATP) following P2Y2 inhibition. Pharmacological inhibition of P2Y2 with Kaempferol (a specific P2Y2 inhibitor) (Figure 1h and 1j), or depletion of P2Y2 by means of specific short hairpin RNAs (Figure 1i) or small interfering RNAs (Figure 1k and 1l), increased IL-1β release from PMA-treated THP1 macrophages primed with LPS and simulated with ATP (LPS+ATP) or from human monocyte derived macrophages (hMDMs), thus revealing that P2Y2 interferes with inflammasome activation. Accordingly, PMA- differentiated THP1 macrophages released the cell death marker, lactate dehydrogenase (LDH), upon treatment or not with LPS+ATP following P2Y2 inhibition with Kaempferol (Figure 1m). This LPS+ATP-induced THP1-cell death was inhibited by depletion of caspase-1 (CASP1) (Figure 1m and supplementary Figure S2). These results are consistent with the interpretation that P2Y2 inactivation favours CASP1-dependent macrophage pyroptosis. Altogether these results indicate that P2Y2 antagonizes inflammasome activation.

P2Y2 activation impairs the oligomerization of NLRP3 inflammasome.
Considering the functional interaction between P2Y2 and NLRP3 that we initially described [9], we then investigated the impact of P2Y2 on the activation of NLRP3 inflammasome. Pharmacological stimulation of P2Y2 with agonists Diquafosol (Figure 2a, 2b and supplementary Figure S3a and S3b) or 4-thiouridine-5′-triphosphate (supplementary Figure S3a and S3b) impaired IL-1β release from PMA-treated THP1 macrophages primed with LPS and stimulated with ATP (LPS+ATP) (Figure 2a and supplementary Figure S3a and S2b), or Nigericin (LPS+Nigericin) (Figure 2b). P2Y2 agonists prevented the release of pro-caspase-1 (pro-CASP1) and its cleaved form (cleaved-CASP1) in the supernatant from PMA-treated THP1 macrophages stimulated with LPS+ATP (Figure 2c and supplementary Figure S 3c-S3g) or LPS+Nigericin (Figure 2d and supplementary Figure S3h), or from bone-marrow-derived-macrophages (BMDMs) stimulated with LPS+ATP (Figure 2e, 2f and supplementary Figure S3i and S3j). These results were corroborated by the detection of IL-1β and IL-18 release from LPS+ATP-stimulated BMDMs that were treated with Diquafosol (Figure 2g, 2h and supplementary Figure S3k and S3l). To evaluate the possibility that P2Y2 agonists may act through the modulation of NLRP3 and ASC expression,

mRNA expression levels of NLRP3, ASC, pro-CASP1 and pro-IL-1β were analysed in PMA-THP1 macrophages that were stimulated with LPS+ATP (supplementary figure S4a-d) or LPS+Nigericin (supplementary Figure S4e-h) in presence or absence of Diquafosol or 4-thiouridine-5'-triphosphate (supplementary Figure S4a-h). Despite the fact that in response to LPS+ATP (supplementary Figure S4a-d) or LPS+Nigericin (supplementary Figure S4e-h) stimulation, NLRP3 (supplementary Figure S4a and S4e) and pro-IL-1β (supplementary Figure S4d and S4h) mRNA levels were increased and ASC mRNA levels were found decreased (supplementary Figure S4b and S4f). No significant difference in the expression levels of mRNAs was found when cells were treated with P2Y2 agonists. This demonstrates that P2Y2 agonists did not affect the transcription of NLRP3, ASC, pro-CASP1 or IL-1β. Then, cellular lysates from LPS+ATP-stimulated BMDMs that were treated with or without Diquafosol (supplementary Figure S4i and S4k) or from LPS+ATP-stimulated THP1 macrophages that were treated with or without 4-thiouridine-5'-triphosphate (supplementary Figure S4j and S4l) were analysed for NLRP3 protein expression levels. Consistent with the decrease in IL-1β secretion and proteolytical cleavage of CASP1 that we previously shown (Figure 2a-h and supplementary Figure S3a-l)), P2Y2 agonists impaired the increased expression levels of NLRP3 that were detected when BMDMs (supplementary Figure S4i and S4k) or PMA-THP1 macrophages (supplementary Figure S4j and S4l) were stimulated with LPS+ATP, thus revealing that P2Y2 may act on NLRP3 inflammasome at post-transcriptional levels.

To further investigate the role of P2Y2 in the regulation of NLRP3 inflammasome, we studied the effects of P2Y2 agonists on NLRP3 oligomerization, which is a central event involved in the NLRP3 inflammasome activation [2]. We thus performed a fluorescence microscopy with LPS+Nigericin-primed BMDMs that were treated in presence or in absence of Diquafosol. In BMDMs treated with LPS+Nigericin, NLRP3 colocalized with ASC speck (Figure 2i). Interestingly, we observed that P2Y2 activation with Diquafosol significantly impaired the colocalization between NLRP3 and ASC (Figure 2i and 2j). This effect was also observed in BMDMs that were treated with LPS+Nigericin in presence of 4-thiouridine-5'-triphosphate (Figure 2k and supplementary Figure 5a), thus demonstrating that P2Y2 negatively modulates NLRP3 inflammasome activation through the repression of NLRP3 oligomerization.

P2Y2 agonists restricts the replication of SARS-CoV-2 into permissive cells

Initially reported in immune cells including dendritic cells [26], monocytes [27] and macrophages [27], inflammasomes also assemble in several non-immune cells such as epithelial cells [16, 28]. We previously revealed that NLRP3 inflammasome activation regulates host epithelial cell permissiveness to SARS-CoV-2 infection [16]. According to the previously described role of P2Y2 on the modulation of NLRP3 inflammasome activation, we then determined the impact of P2Y2 modulation on the replication of SARS-CoV-2. Interestingly, Diquafosol and other P2Y2 agonists (UTP and Denufosol) strongly reduced cytopathogenic effects associated with viral infection and/or blocked the replication of SARS- CoV-2 in permissive host Vero E6 cells (Figure 3a-d, 3g, 3h and supplementary Figure S6a) or human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expressing lung A549 (ACE2-A549) cells (Figure 3e and supplementary Figure S6b and S6c), as

revealed by the SARS-CoV-2 – mediated cytopathogenicity (Figure 3a and 3b), the detection of viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and E mRNA expression (Figure 3c-f and supplementary Figure S6b), the intracellular expression of viral spike (S) protein (supplementary Figure S6a and S6c) and the frequency of S-positive cells (Figure 3g and 3h). Inversely, the pharmacological inhibition with Kaempferol or P2Y2 depletion favoured viral replication in primary salivary gland epithelial cells (Figure 4f) or ACE2-A549 cells (supplementary Figure S6d). Considering that NLRP3 contributes to viral replication at post-entry level [16], we then examined whether P2Y2 control SARS-CoV-2 replication as the same level or through the modulation of viral entry. As previously described [16], we studied the effects of UTP and Diquafosol on viral entry by using SARS-CoV-2 spike (S) pseudotyped HIV-1. Vero E6 cells (supplementary Figure S7a), ACE2-A549 cells (supplementary Figure S7b) and ACE2 and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing A549 (ACE2-TMPRSS2-A549) cells (supplementary Figure S7c) were incubated with UTP, Diquafosol or serum of convalescent COVID-19 patients during 4 hours before infection with HIV1NL4-$3_{\Delta Env}$ variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-LV) (supplementary Figure S7a-c). We analysed the viral entry by detecting the intracellular expression of HIV-1 Cap24 capsid in Vero E6 (supplementary Figure S7a), ACE2-A549 cells (supplementary Figure S6b) and ACE2-TMPRSS2-A549 cells (supplementary Figure S7c). Despite the fact serum from convalescent patients strongly reduced its intracellular expression (supplementary Figure S7a-c), the intracellular expression of Cap24 did not change in presence of the agonists of P2Y2 (UTP and Diquafosol), implying that P2Y2 agonists do not affect SARS-CoV-2 entry into host cells (supplementary Figure S7a-c). Interestingly, ASC specks detected in SARS-CoV2-infected ACE2-A549 cells (Figure 3i and 3k) or Caco-2 cells (Figure 3j and 3l) were inhibited by Diquafosol, thus confirming the negative regulatory effect of P2Y2 on NLRP3 oligomerization during SARS-CoV-2 infection. Altogether, the results demonstrate that P2Y2 acts as cellular host restriction factor against SARS-CoV-2.

The P2Y2 agonist Diquafosol inhibits bleomycin-induced lung inflammation and injury

Considering the critical role of NLRP3 inflammasome during bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis [29], we therefore investigated whether P2Y2 activation may decrease pulmonary injuries and performed in vivo studies with P2Y2 agonist Diquafosol (received 3 days before instillation and every 3 days until 20 days after instillation) in mice that were intratracheally instillated with bleomycin. Using micro-computed tomography analysis, we detected a significant increase of lung density at day 20 in mice that were treated with bleomycin, as compared to control mice or Diquafosol-treated mice (Figure 4a), revealing the development of pulmonary injuries. Interestingly, mice treated with P2Y2 agonist Diquafosol and bleomycin showed a strong reduction of lung density as compared to those treated with bleomycin alone (Figure 4a), thus revealing the ability of P2Y2 agonist Diquafosol to reduce bleomycin-induced pulmonary injuries. To precise the biological effects of Diquafosol during bleomycin-induced lung injuries, immune infiltrates were analyzed at day 21 using eosin-hematoxylin staining. We detected the presence of perialveolar and perivascular immune infil-

trates in lung biopsies obtained from bleomycin-treated control mice (Figure 4b). We also revealed that Diquafosol significantly inhibited the infiltration of immune cells in bleomycin-treated lung tissues (Figure 4b), as compared to the lung biopsies obtained from bleomycin-treated mice (Figure 4b). To precisely identify macrophage populations that are affected by Diquafosol during bleomycin-induced lung injuries, alveolar ($CD45^{+}SiglecF^{+}CD11b^{-}CD11c^{+}CD169^{+}$) and interstitial ($CD45^{+}SiglecF^{-}CD11b^{+}Ly6C^{-}CD64^{+}$) macrophages were analysed at day 21 (supplementary Figure 8). Despite the fact the number of alveolar $CD45^{+}SiglecF^{+}CD11b^{-}CD11c^{+}CD169^{+}$ macrophages was not affected in bleomycin-treated mice as compared to control mice (Figure 4c and 4d), we observed a significant increase in the number of interstitial macrophages detected in bleomycin-treated mice (Figure 4e and 4f). No effect of Diquafosol was observed at day 21 on alveolar macrophages (Figure 4c and 4d), but interestingly, we observed a significant reduction in the number of interstitial macrophages detected in bleomycin-treated mice that were treated with Diquafosol (Figure 4e and 4f), thus revealing that Diquafosol impairs the infiltration of macrophages into lung parenchyma, which has been identified as critical events for lung injuries [30]. Altogether, these results reveal the ability of P2Y2 agonist Diquafosol to repress lung inflammation and the development of associated injuries.

Discussion

Pathologic NLRP3 inflammasome activation has been associated with several human diseases including pulmonary inflammatory diseases, COVID-19 and ALI/ARDS [5, 6]. A better understanding of molecular mechanisms regulating inflammasome activation is a key step for the identification of novel therapeutic approaches targeting NLRP3 inflammasomopathies. We previously revealed that two major sensors of danger signals, namely, P2Y2 and NLRP3, constitutively interact and are functionally linked during SIV and HIV infection [9]. Their interaction is increased on HIV-1-infected monocytes, macrophages and lymphocytes during the early acute and chronic steps of viral infection. We showed P2Y2 and NLRP3 regulate host cell susceptibility to HIV-1 through the modulation of viral entry. P2Y2 facilitates HIV-1 entry into target cells and inversely, NLRP3 represses it through the inhibition of host cytoskeleton remodelling. Interestingly, we demonstrated that P2Y2-dependent signaling pathway, which is triggered by the binding of HIV-1 envelope to target cell coreceptors, induces the ubiquitinylation and the degradation of NLRP3, thus allowing viral entry. This report initially revealed that the activation of P2Y2 antagonizes NLRP3 biological activities [9]. In the present study, we further characterized the interplay between P2Y2 and NLRP3 during inflammasome activation. We studied signs of inflammasome activation in $P2y2^{-/-}$ mice and observed a significant increase of plasma IL-1β levels and pyroptotic death of alveolar macrophages in $P2y2^{-/-}$ mice, as compared to $P2y2^{+/+}$ mice. These results were confirmed in vitro after pharmacological inhibition (with Kaempferol) or genetic depletion of P2Y2 in hMDMs, thus indicating that the purinergic receptor P2Y2 acts as an endogenous repressor of inflammasome activation. Inflammasome activation generally requires a priming step in response to stimulatory signals (such as LPS) and a protein complex assembly step in response to activation signals (such as ATP or Nigericin) [3]. Here, we report that P2Y2 inactivation is sufficient for inflammasome activation, thus interrogating the signaling pathways triggered by P2Y2 inactivation. Additional investigations are needed to precisely decipher P2Y2-dependent signaling pathways involved in the regulation of inflammasome activation. In this report, we also showed that P2Y2 agonists such as 4-ThioUTP or Diquafosol significantly inhibited proteolytic caspase-1 activation and IL-1β secretion from macrophages stimulated with LPS+ATP or LPS+Nigericin, thus revealing that the stimulation of P2Y2 can inhibit NLRP3 inflammasome activation. This process is associated with a reduced expression of NLRP3 protein levels and the inhibition of ASC oligomerization and NLRP3 inflammasome assembly, but did not affect NLRP3 mRNA expression levels. Inversely, P2Y2 inactivation also enhanced ASC oligomerization in PMA-THP1 macrophages (data not shown). Altogether, our results identify an unexpected role of P2Y2 in the regulation of NLRP3 protein expression (at post-translational level) as well as ASC oligomerization and NLRP3 inflammasome assembly. Molecular mechanisms involved in these processes remain to be elucidated and should pave the way for the identification of novel molecular targets for the treatment of NLRP3 inflammasomopathies.

We then evaluated the ability of P2Y2 agonists Denufosol, Diquafosol and UTP to repress NLRP3 inflammasome activity in physiopathological situations. Considering the contribution of P2Y2 and NLRP3 to the entry of HIV-1 into target cells [9], we investigated the biological effects of P2Y2 and NLRP3 on the early steps of SARS-COV-2 infection. We demonstrated that NLRP3 acts at post-entry level and favours viral replication into epithelial cell lines that overexpressed or constitutively expressed ACE2 (such as ACE2-A549 cells, Vero E6 cells, Caco2 cells or primary epithelial cells). The purinergic receptor P2X7, which can act upstream NLRP3 inflammasome, was also shown to control SARS-CoV-2 replication [16]. Here we reported that P2Y2 also regulates the susceptibility to SARS-CoV-2 by acting at post-entry level and by antagonizing NLRP3-mediated effects on viral replication. These results showed that P2Y2 negatively regulates NLRP3 biological functions in epithelial cells and acts as a cellular host restriction factor against SARS-CoV-2.

In this report, we also studied biological activities of P2Y2 agonists during bleomycin- induced pulmonary inflammation and fibrosis, which is dependent on NLRP3 inflammasome [29]. We revealed that Diquafosol abrogated pulmonary injuries and immune cell infiltration in bleomycin-treated animals. The percentage of interstitial macrophages, which play a key role in the early stages of bleomycin-induced lung injuries [31], is significantly reduced in Diquafosol-treated mice. Our results thus underline a mechanism that depends on P2Y2 activation and restrains bleomycin-induced pulmonary injuries. The proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2), which regulates macrophage adhesion, migration and activation [32] and can be activated by P2Y2 [33], was recently involved in the induction of bleomycin-induced lung fibrosis [34]. In response to LPS+Nigercin stimulation, Pyk2 interacts with ASC and NLRP3, controls ASC phosphorylation and oligomerization and promotes the assembly of NLRP3 inflammasome [35]. Pyk2 also accumulates to the ring of macrophage podosomes surrounding F-actin cores or colocalizes with F-actin when interaction with ASC is reduced [34]. Colocalization of Pyk2 with F-actin correlates negatively with NLRP3 inflammasome activation, suggesting that NLRP3, ASC and F-actin compete for Pyk2. Accordingly, P2Y2- dependent NLRP3 degradation was shown permissive of Pyk2-dependent cytoskeletal reorganization, which is required for the entry of HIV-1 into target cells [9]. Further investigations to evaluate effects of P2Y2 agonists on Pyk2 localization are needed. Considering that P2Y2 and Pyk2 can be activated by tensile stress such as fluid shear stress [36], a better understanding of signaling pathways involving P2Y2, NLRP3, ASC and Pyk2 should help to specify molecular link between mechanical transduction and macrophage activation and could have significant implications for several human lung inflammatory diseases.

Altogether, our study provides the first rationale for testing P2Y2 agonists, such as Diquafosol and Denufosol, which have been previously approved or proposed for the treatments of dry eye [37] and cystic fibrosis [38], respectively, as NLRP3 negative modulators for blocking viral replication and COVID-19-associated hyper-inflammation in SARS-CoV-2-infected patients or for restraining lung injuries in patients with idiopathic pulmonary fibrosis patients or acute

respiratory distress syndrome (ARDS). The repurposing of P2Y2 agonists for the treatment of other human diseases associated with excessive activation of NLRP3 inflammasome, such as cryopyrin-associated periodic syndromes, rheumatoid arthritis, obesity or Alzheimer's disease [39], should be also investigated.

Figure legends

FIGURE 1. Increased plasma IL-1β secretion and pyroptosis of interstitial macrophages in P2y2$^{-/-}$ mice.

a-g) Plasma IL-1β (a), representative flow cytometry analysis (b), frequencies of interstitial Gr1^{-} CD11b^{+}CD11c^{high}CD40^{+} macrophages (c), representative images (d, f) and frequencies (e, g) of cleaved Caspase-1^{+} (CASP1^{+}) CD40^{+} macrophages (d, e)) or TUNEL^{+}CD40^{+} macrophages (f, g) were determined from 7 to 8 wild-type P2y2$^{+/+}$ mice and 8 to 9 P2y2$^{-/-}$ mice. h, i) Control or LPS+ATP-stimulated PMA-THP1 macrophages treated with Kaempferol (Kaempf.) (h), or depleted for P2Y2 (shRNA P2Y2) or control (shRNA Co.) (i) were analyzed for IL-1β release. j-l) Human monocyte-derived macrophages (hMDMs) treated with IFNγ (j), Kaempferol (Kaempf.) (j) or depleted for P2Y2 (siRNA P2Y2) (k) were analyzed for IL-1β release in the supernatant (SN) of treated cells (j, k) and for P2Y2 expression (l). m) Kaempferol (Kaempf.)-treated, control or CASP1-depleted PMA-THP1 macrophages were analysed for LDH release after stimulation with LPS and ATP. Nuclei and cellular shapes are detected using Hoechst 33342 and phase contrast in (d) and (f). Scale bars in (d) and (f) are 5 µm. Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative images and western blots are shown. Data are presented as means ± SEM. Two-tailed Mann-Withney test (a, c, e and g) and two-way ANOVA analyses (h, i and m) were used. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

FIGURE 2. P2Y2 agonists regulate NLRP3-dependent inflammasome activation through negative modulation of ASC oligomerization.

a-h) Control, LPS+ATP- (a, c, e-h) or LPS+Nigericin (LPS+Nig.) (b, d) stimulated human PMA-THP1 macrophages (a-d) or mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (e-h) treated with Diquafosol (Diqua.) were analyzed for IL-1β (a, b, g, h) and for expression of pro-caspase-1 (pro-CASP1) and proteolytic cleavage of pro-CASP1 (cleaved CASP1 (c-f). i, j) Colocalization of NLRP3 (red) and ASC (green) proteins (NLRP3-ASC+) in LPS+Nigericin (LPS+Nig.) stimulated human PMA-THP1 macrophages treated with Diqua. were analyzed using fluorescent microscopy (i) and quantified (j). Percentages of human PMA-THP1 macrophages with NLRP3-ASC colocalization (NLRP3-ASC^{+}) are shown. k) Percentages of human PMA-THP1 macrophages with NLRP3-ASC colocalization (NLRP3-ASC^{+}) after stimulation with LPS+Nig. and treatment with 4-thiouridine-5'-triphosphate (4-Thio.) were quantified and shown. Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative images and western blots are shown. Data are presented as means ± SEM. Two-tailed Mann-Withney test (f, h) and one-way ANOVA (g, j, k) analyses were used. **P < 0.01 and ****P < 0.0001.

FIGURE 3. P2Y2 agonists dictate cytopathogenicity and susceptibility to SARS-CoV-2 infection through the modulation of viral replication.

a, b) Cytopathogenicity of Vero E6 cells that were infected or not with SARS-CoV-2 (MOI=1 or 2) during 72 hours in presence of indicated concentrations of Diquafosol (Diqua.) (a) or Denufosol (Denu.) (b) were analyzed using MTT assays. c-h) Vero E6 cells (c, d, g, h), ACE2-A549

cells (e) and primary epithelial cells (f) were respectively infected with SARS- CoV-2 (MOI=0.1 or 0.2) during 24 (c, d, g, h) or 48 (e, f) hours in presence of 500 µM UTP, 100 µM Diquafosol (Diqua.), 5 mM Denufosol (Denu.) or 100 µM Kaempferol (Kaempf.). Intracellular mRNA expressions of RdRp (c, f) and E (d, e) were analyzed using quantitative RT-PCR (c-f). Spike positive cells were imaged (g) and quantified (h) using fluorescence microscopy. Representative images (g) of 3 independent experiments are shown. i-l) ACE2- A549 cells (i, k) and Caco-2 cells (j, l) were respectively infected with SARS-CoV-2 (MOI=1) during 48 hours in presence of 100 µM Diquafosol (Diqua.). Cells showing ASC+ specks were imaged (i, j) and quantified (k, l) using fluorescence microscopy. Representative images (i, j) of 3 independent experiments are shown. Fold changes of RdRp and E RNA from SARS-CoV-2 infected Vero E6 cells (n=3) and ACE2-A549 cells (n=2-3) are shown (c- f). Scale bar in (i) is 10 µm. Data are presented as means ± SEM. One-way (a-e, h, k and l) ANOVA analyses and two-tailed Mann-Withney (f) test were used. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

FIGURE 4. P2Y2 agonist Diquafosol inhibits bleomycin-induced lung injury and inflammation.

a) Computated tomography (CT) scans of lung density from mice that were treated with control, bleomycin (Bleo), Diquafosol (Diqua.) or bleomycin and Diquafosol (+Bleo.+Diqua.) during 21 days were obtained. CT scans from 3 independent experiments are shown. b) Sections of lungs obtained from control, Bleo.-, Diqua.- or Bleo.+Diqua.-treated mice were stained with hematoxylin and eosin and analyzed. Representative images are shown. c, d) Representative flow cytometry analyses of alveolar ($CD45^+SiglecF^+CD11b^-CD11c^+CD169^+$) macrophages (c) and interstitial $CD45^+SiglecF^-CD11b^+Ly6C^-CD64^+$ macrophages (d) determined 21 days after intratracheal instillation in control, Bleo.-, Diqua.- or Bleo.+Diqua.-treated mice are shown (n=9-19 mice/group). e, f). Numbers of alveolar macrophages (e) and interstitial macrophages (f) determined 21 days after intratracheal instillation in control, Bleo.-, Diqua.- or Bleo.+Diqua.-treated mice are shown (n=9-19 mice/group). Data were obtained from 2 independent experiments and are presented as means ± SEM. One-way (e, f) ANOVA analyses were used. **P < 0.01.

Supplementary materials

SUPPLEMENTARY FIGURE S1. Flow cytometry detection of interstitial macrophages in P2y2$^{+/+}$ and P2y2$^{-/-}$ mice.

a) Representative gating strategy for the quantification of interstitial macrophages in P2y2+/+ and P2y2-/- mice is shown.

SUPPLEMENTARY FIGURE S2. Validation of Caspase-1 knockdown.

a) Caspase-1 (CASP1) expression of control (shCo.) and CASP1 (shCASP1-1 and -2)-depleted, PMA-THP1 macrophages was determined by western blot. GAPDH expression was used as loading control. Representative western blot of 3 independent experiments is shown.

SUPPLEMENTARY FIGURE S3. P2Y2 agonists negatively regulate the secretion of IL- 1β, pro-caspase-1, cleaved caspase-1 and IL-18.

a-l) Control, LPS+ATP- (a-g, i-l) or LPS+Nigericin (LPS+Nig.) (h) stimulated human PMA-THP1 macrophages (a-h) or mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (i-l) treated with Diquafosol (Diqua.) (a-d, h-l) or with 4-thiouridine-5′-triphosphate (4-Thio.) (a, b, e) were analyzed for IL-1β secretion (a, b), for the expression of secreted pro-caspase-1 (pro-CASP1) and proteolytic cleavage of pro-CASP1 (cleaved CASP1) (c-j) and IL-18 secretion (k, l). Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative experiments (a, k) and western blots (e) are shown. Data are presented as means ± SEM. One- way (b) ANOVA analyses, unpaired two-tailed t-test (c, d, f-j and l) were used. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

SUPPLEMENTARY FIGURE S4. P2Y2 agonists did not affect the mRNA expression levels of NLRP3, ASC, pro-caspase-1 and pro-IL-1β.

a-h) Control, LPS+ATP- (a-d) or LPS+Nigericin (LPS+Nig.) (e-h) stimulated human PMA- THP1 macrophages treated with Diquafosol (Diqua.) or with 4-thiouridine-5′-triphosphate (4- Thio.) (a-h) were analyzed for mRNA expression levels of NLRP3 (a, e), ASC (b, f), pro-caspase-1 (pro-CASP1) (c, g) and pro-interleukin 1β (pro-IL-1β) (d, h). i-l) Control or LPS+ATP-stimulated bone marrow-derived macrophages (BMDMs) (i, k) or human PMA- THP1 macrophages (j, l) treated with Diquafosol (Diqua.) (i, k) or with 4-thiouridine-5′- triphosphate (4-Thio.) (j, l) were analyzed for NLRP3 expression (i-l). β-actin expression was used as loading control (i, j). Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative western blots are shown. Data are presented as means ± SEM. One-way (a-h) ANOVA analyses and unpaired two-tailed t-test (k, l) were used. *P < 0.05; **P < 0.01, ***P < 0.001 and ****P < 0.0001.

SUPPLEMENTARY FIGURE S5. The P2Y2 agonist 4-thiouridine-5′-triphosphate inhibits LPS+Nigericin-mediated NLRP3-ASC^{+} speck formation.

a) Colocalization of ASC (green) and NLRP3 (red) proteins (NLRP3-ASC+) in LPS+Nigericin (LPS+Nig.) stimulated bone marrow-derived macrophages (BMDMs) treated with 4-

thiouridine-5′-triphosphate (4-Thio.) were analyzed using fluorescent microscopy. Nuclei are stained with Hoechst 33342. Representative images are shown (scale bar, 10 µm).

SUPPLEMENTARY FIGURE S6. Effects of P2Y2 agonists and depletion on the replication of SARS-CoV-2.

a-c) Vero E6 cells (a) and ACE2-A549 cells (b, c) were infected or not with SARS-CoV-2 (MOI=1 or 2) during 24 (a) or 48 (b, c) hours in presence of 500 µM UTP (a-c) or 100 µM Diquafosol (Diqua.) (a, b) and analyzed for Spike expression (using western blot analysis) (a, c) or intracellular mRNA expression of RdRp (using quantitative RT-PCR) (b). GAPDH expression was used as loading control (a, c). Fold changes of RdRp from SARS-CoV-2 infected ACE2-A549 cells are shown (b). d) Control or P2Y2-depleted ACE2-A549 cells were infected or not with SARS-CoV-2 (MOI=2) during 48 hours and analyzed for intracellular mRNA expression of RdRp (using quantitative RT-PCR). Fold changes of RdRp from SARS-CoV-2 infected, control or P2Y2-depleted ACE2-A549 cells are shown. Results were obtained from at least 3 independent experiments. Representative western blots are shown. Data are presented as means ± SEM. One-way (B) ANOVA analyses and unpaired two-tailed t-test (d) were used. *P < 0.05 and **P < 0.01.

SUPPLEMENTARY FIGURE S7. P2Y2 agonists UTP and Diquafosol did not affect viral entry of SARS-CoV-2 into host cells.

a-c) Vero E6 (a), ACE2-A549 (b) or ACE2-TMPRSS2-A549 (c) cells were incubated during 4 hours with control, 500 µM UTP or 100 µM Diquafosol (Diqua.), and infected for 48 hours with HIV-1NL4-3ΔEnv variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV- 2 spike (S) envelope (S-LV) or with S-LV neutralized with convalescent COVID-19 serum. Then, cells were analyzed for intracellular HIV-1 CAp24 capsid expression (a-c). β-actin was used as loading control (a-c). Representative western blots are shown. In (b), the asterisk (*) is indicating a non-specific band.

SUPPLEMENTARY FIGURE S8. Flow cytometry detection of interstitial and alveolar macrophages from mice that were treated with control, bleomycin (Bleo), Diquafosol (Diqua.) or bleomycin and Diquafosol (+Bleo.+Diqua.) during 21 days.

a, b) Representative gating strategies for the detection and the quantification of interstitial (a) and alveolar macrophages (b) in treated mice is shown.

Supplemental Tables S1 and S2

Table S1. Human siON-TARGETplus SMARTpool and shRNA used in this study.

Human target	sg	Target sequence	Reference
siON-TARGETplus Non-targeting Control Pool	1	UGGUUUACAUGUCGACUAA	Dharmacon (D-001810-10-20)
	2	UGGUUUACAUGUUGUGUGA	
	3	UGGUUUACAUGUUUUCUGA	
	4	UGGUUUACAUGUUUUCCUA	
siON-TARGETplus Human P2RY2	1	CGAGAACACUAAGGACAUU	Dharmacon (L-003688-00-0005)
	2	CGACAGAACUGACAUGCAG	
	3	GGAAUGCGUCCACCACAUA	
	4	UGCCGCUGCUGGUCUAUUA	
pLKO.1 sh-1Caspase-1	1	ATAATGAGAGCAAGACGTGTG	
pLKO.1 sh-2Caspase-1	2	AGCATCATCCTCAAACTCTTC	

Table S2. Sequences of primers and probes used to quantify the RdRp and E genes.

Gene target	Primers and Probe sequences	Reference
SARS-Cov-2 RdRp	F: GGTAACTGGTATGATTT R: CTGGTCAAGGTTAATATA Probe: [FAM]TCATACAAACCACGCCAGG[BHQ1]	Eurofins - Customized
SARS-Cov-2 E-gene	F: ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT R: ATATTGCAGCAGTACGCACACA Probe: [FAM]CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC[BBQ]	TIB MolBiol
β-actin (human) (for epithelial cells)	F 5′: CACCATTGGCAATGAGCGGTTC R 3′: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT SYBR-Green	Origene (NM_001101)

Acknowledgements

We gratefully acknowledge NH TherAguix SAS and ENS Paris-Saclay for supporting our effort against COVID-19 pandemic, and Imaging and Cytometry Platform (Y. Lecluse and S. Salome-Desnoulez), IMS 3655 CNRS / US 23 INSERM from Gustave Roussy Cancer Campus (Villejuif, France) for technical support. This work was supported by funds from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-IBHU-0001, ANR-10-LABX33, ANR-11- IDEX-003-01 and ANR Flash COVID-19 "MacCOV"), Fondation de France (alliance "tous unis contre le virus"), Electricité de France, Fondation Gustave Roussy, Institut National du Cancer (INCa 9414 and INCa 16087), The SIRIC Stratified Oncology Cell DNA Repair and Tumor Immune Elimination (SOCRATE), Fédération Hopitalo-Universitaire (FHU) CARE (Cancer and Autoimmunity Relationships) (directed by X. Mariette, Hôpital Bicêtre, AP-HP) and Université Paris-Saclay (to Jean-Luc Perfettini), and REACTing and the Fondation pour la Recherche Médicale (AM-CoV-Path program) (to Roger Le Grand). We thank the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM, Paris, France) "One Health" and "Immunothérapies, auto- immunité et Cancer" (ITAC) for its support. The Infectious Disease Models and Innovative Therapies research infrastructure (IDMIT) is supported by the "Programmes Investissements d'Avenir" (PIA), managed by the ANR under references ANR-11-INBS-0008 and ANR-10- EQPX-02-01. Emie Gutierrez-Mateyron and Aurélia Deva Nathan are recipients of PhD fellowships from French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. Déborah Lécuyer and Désirée Tannous are recipients of PhD fellowships from LabEx LERMIT and Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Cifre#2019/0639), respectively. Ali Mostefa-Kara is recipient of PhD fellowship from Ecole et Loisir.

Footnotes

Author contributions:

Jean-Luc Perfettini provided financial support. Jean-Luc Perfettini designed and conducted the study. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra, Vanessa Petit, Clémence Richetta, Lydia Meziani, Ali Mostefa-Kara, Romain Marlin, Pauline Maisonnasse, Julia Delahousse, Juliette Pascaud, Marie Naigeon, Olivier Delelis and Awatef Allouch performed experiments. Isabelle Couillin provides *P2y2*$^{+/+}$ and *P2y2*$^{-/-}$ transgenic mice. Xavier Mariette provided cultures of salivary gland epithelial cells. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra, Vanessa Petit, Lydia Meziani, Ali Mostefa-Kara, Anais Chapel, Eric Deutsch, Eric Deprez, Nathalie Chaput, Angelo Paci, Véronique Saada, David Ghez, Isabelle Couillin, Xavier Mariette, Olivier Delelis, Roger Le Grand and Jean-Luc Perfettini analyzed the results. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra and Lydia Meziani assembled the figures. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra and Anais Chapel performed statistic analysis. Emie Gutierrez-Mateyron, Aurélia Deva Nathan, Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Audrey Paoletti, Frédéric Subra, Vanessa Petit, Clémence Richetta, Lydia Meziani, Ali Mostefa-Kara, Romain Marlin, Pauline Maisonnasse, Julia Delahousse, Juliette Pascaud, Anais Chapel, Eric Deutsch, Eric Deprez, Marie Naigeon, Nathalie Chaput, Angelo Paci1, Véronique Saada, David Ghez, Isabelle Couillin, Xavier Mariette, Olivier Delelis, Roger Le Grand, Awatef Allouch and Jean-Luc Perfettini wrote the initial draft. All authors approved the final version.

Conflict of Interest:

Déborah Lécuyer, Désirée Tannous, Awatef Allouch, Frédéric Subra, Olivier Delelis and Jean-Luc Perfettini are listed as co-inventors on a patent application related to SARS-CoV-2 therapy. Désirée Tannous and Awatef Allouch were employed by NH TherAguix SAS. Angelo Paci, Eric Deutsch and Jean-Luc Perfettini are founding members of Findimmune SAS, an Immuno-Oncology Biotech company. Jean-Luc Perfettini disclosed research funding not related to this work from NH TherAguix and Wonna Therapeutics. Nathalie Chaput disclosed research funding not related to this work from GlaxoSmithKline, Roche, Cytune pharma and Sanofi. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010: 140(6): 821-832.

2. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014: 157(5): 1013-1022.

3. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* 2019: 19(8): 477-489.

4. Zaki MH, Lamkanfi M, Kanneganti TD. The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. *Trends Immunol* 2011: 32(4): 171-179.

5. Hosseinian N, Cho Y, Lockey RF, Kolliputi N. The role of the NLRP3 inflammasome in pulmonary diseases. *Ther Adv Respir Dis* 2015: 9(4): 188-197.

6. Sefik E, Qu R, Junqueira C, Kaffe E, Mirza H, Zhao J, Brewer JR, Han A, Steach HR, Israelow B, Blackburn HN, Velazquez SE, Chen YG, Halene S, Iwasaki A, Meffre E, Nussenzweig M, Lieberman J, Wilen CB, Kluger Y, Flavell RA. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature* 2022: 606(7914): 585-593.

7. Burnstock G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv* 2018: 2: 2398212818817494.

8. Seror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saidi H, Nardacci R, Voisin L, Paoletti A, Law F, Martins I, Amendola A, Abdul-Sater AA, Ciccosanti F, Delelis O, Niedergang F, Thierry S, Said-Sadier N, Lamaze C, Metivier D, Estaquier J, Fimia GM, Falasca L, Casetti R, Modjtahedi N, Kanellopoulos J, Mouscadet JF, Ojcius DM, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *J Exp Med* 2011: 208(9): 1823-1834.

9. Paoletti A, Allouch A, Caillet M, Saidi H, Subra F, Nardacci R, Wu Q, Muradova Z, Voisin L, Raza SQ, Law F, Thoreau M, Dakhli H, Delelis O, Poirier-Beaudouin B, Dereuddre- Bosquet N, Le Grand R, Lambotte O, Saez-Cirion A, Pancino G, Ojcius DM, Solary E, Deutsch E, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL. HIV-1 Envelope Overcomes NLRP3-Mediated Inhibition of F-Actin Polymerization for Viral Entry. *Cell Rep* 2019: 28(13): 3381-3394 e3387.

10. Huang Z, Xie N, Illes P, Di Virgilio F, Ulrich H, Semyanov A, Verkhratsky A, Sperlagh B, Yu SG, Huang C, Tang Y. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2021: 6(1): 162.

11. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2016: 16(3): 177-192.

12. Franceschini A, Capece M, Chiozzi P, Falzoni S, Sanz JM, Sarti AC, Bonora M, Pinton P, Di Virgilio F. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J* 2015: 29(6): 2450-2461.

13. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 2017: 47(1): 15-31.

14. Dechelle-Marquet PA, Guillonneau X, Sennlaub F, Delarasse C. P2X7-dependent immune pathways in retinal diseases. *Neuropharmacology* 2023: 223: 109332.

15. Wang D, Wang H, Gao H, Zhang H, Zhang H, Wang Q, Sun Z. P2X7 receptor mediates NLRP3 inflammasome activation in depression and diabetes. *Cell Biosci* 2020: 10: 28.

16. Lécuyer D, Nardacci R, Tannous D, Gutierrez-Mateyron E, Deva Nathan A, Subra F, Di Primio C, Quaranta P, Petit V, Richetta C, Mostefa-Kara A, Del Nonno F, Falasca L, Marlin R, Maisonnasse P, Delahousse J, Pascaud J, Deprez E, Naigeon M, Chaput N, Paci A, Saada V, Ghez D, Mariette X, Costa M, Pistello M, Allouch A, Delelis O, Piacentini M, Le Grand R, Perfettini JL. The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv* 2023.

17. Wang S, Zhao J, Wang H, Liang Y, Yang N, Huang Y. Blockage of P2X7 attenuates acute lung injury in mice by inhibiting NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol* 2015: 27(1): 38-45.

18. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, Gombault A, Couegnat M, Fick L, Kanellopoulos J, Quesniaux VF, Marchand-Adam S, Crestani B, Ryffel B, Couillin I. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010: 182(6): 774-783.

19. Kawano A, Tsukimoto M, Noguchi T, Hotta N, Harada H, Takenouchi T, Kitani H, Kojima S. Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2012: 419(2): 374-380.

20. Kanellopoulos JM, Almeida-da-Silva CLC, Ruutel Boudinot S, Ojcius DM. Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective. *Front Immunol* 2021: 12: 645834.

21. Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA, Boucher RC, Turner JT. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994: 91(8): 3275-3279.

22. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006: 314(5806): 1792-1795.

23. Wu Q, Allouch A, Paoletti A, Leteur C, Mirjolet C, Martins I, Voisin L, Law F, Dakhli H, Mintet E, Thoreau M, Muradova Z, Gauthier M, Caron O, Milliat F, Ojcius DM, Rosselli F, Solary E, Modjtahedi N, Deutsch E, Perfettini JL. NOX2-dependent ATM kinase activation dictates pro-inflammatory macrophage phenotype and improves effectiveness to radiation therapy. *Cell Death Differ* 2017: 24(9): 1632-1644.

24. Allouch A, Voisin L, Zhang Y, Raza SQ, Lecluse Y, Calvo J, Selimoglu-Buet D, de Botton S, Louache F, Pflumio F, Solary E, Perfettini JL. CDKN1A is a target for phagocytosis-mediated cellular immunotherapy in acute leukemia. *Nat Commun* 2022: 13(1): 6739.

25. Meziani L, Mondini M, Petit B, Boissonnas A, Thomas de Montpreville V, Mercier O, Vozenin MC, Deutsch E. CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages. *Eur Respir J* 2018: 51(3).

26. Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 2008: 181(6): 3755-3759.

27. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, van de Veerdonk FL, Ferwerda G, Heinhuis B, Devesa I, Funk CJ, Mason RJ, Kullberg BJ, Rubartelli A, van der Meer JW, Dinarello CA. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009: 113(10): 2324-2335.

28. Abdul-Sater AA, Koo E, Hacker G, Ojcius DM. Inflammasome-dependent caspase-1 activation in cervical epithelial cells stimulates growth of the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis. *J Biol Chem* 2009: 284(39): 26789-26796.

29. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Petrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, Couillin I. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009: 179(10): 903-913.

30. Gu Y, Lawrence T, Mohamed R, Liang Y, Yahaya BH. The emerging roles of interstitial macrophages in pulmonary fibrosis: A perspective from scRNA-seq analyses. *Front Immunol* 2022: 13: 923235.

31. Liborio-Ramos S, Barbosa-Matos C, Fernandes R, Borges-Pereira C, Costa S. Interstitial Macrophages Lead Early Stages of Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Induce Fibroblasts Activation. *Cells* 2023: 12(3).

32. Okigaki M, Davis C, Falasca M, Harroch S, Felsenfeld DP, Sheetz MP, Schlessinger J. Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003: 100(19): 10740-10745.

33. Liu J, Liao Z, Camden J, Griffin KD, Garrad RC, Santiago-Perez LI, Gonzalez FA, Seye CI, Weisman GA, Erb L. Src homology 3 binding sites in the P2Y2 nucleotide receptor interact with Src and regulate activities of Src, proline-rich tyrosine kinase 2, and growth factor receptors. *J Biol Chem* 2004: 279(9): 8212-8218.

34. Joshi H, Almgren-Bell A, Anaya EP, Todd EM, Van Dyken SJ, Seth A, McIntire KM, Singamaneni S, Sutterwala F, Morley SC. L-plastin enhances NLRP3 inflammasome assembly and bleomycin-induced lung fibrosis. *Cell Rep* 2022: 38(11): 110507.

35. Chung IC, OuYang CN, Yuan SN, Li HP, Chen JT, Shieh HR, Chen YJ, Ojcius DM, Chu CL, Yu JS, Chang YS, Chen LC. Pyk2 activates the NLRP3 inflammasome by directly phosphorylating ASC and contributes to inflammasome-dependent peritonitis. *Sci Rep* 2016: 6: 36214.

36. Wang S, Iring A, Strilic B, Albarran Juarez J, Kaur H, Troidl K, Tonack S, Burbiel JC, Muller CE, Fleming I, Lundberg JO, Wettschureck N, Offermanns S. P2Y(2) and Gq/G(1)(1) control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. *J Clin Invest* 2015: 125(8): 3077-3086.

37. Keating GM. Diquafosol ophthalmic solution 3 %: a review of its use in dry eye. *Drugs* 2015: 75(8): 911-922.

38. Ratjen F, Durham T, Navratil T, Schaberg A, Accurso FJ, Wainwright C, Barnes M, Moss RB, Group T-SI. Long term effects of denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2012: 11(6): 539-549.

39. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2018: 17(9): 688.

40. Allouch A, Di Primio C, Paoletti A, Le-Bury G, Subra F, Quercioli V, Nardacci R, David A, Saidi H, Cereseto A, Ojcius DM, Montagnac G, Niedergang F, Pancino G, Saez-Cirion A, Piacentini M, Gougeon ML, Kroemer G, Perfettini JL. SUGT1 controls susceptibility to HIV- 1 infection by stabilizing microtubule plus-ends. *Cell Death Differ* 2020: 27(12): 3243-3257.

Supplementary Material

P2Y2 agonists impair NLRP3-dependent SARS-CoV-2 replication and lung inflammation

Emie Gutierrez-Mateyron et al.,

Supplementary Methods

RNA interference

Human MDMs and ACE2-A549 were transfected using smart pools of siGenome non- targeting control and P2Y2 specific siRNAs from Dharmacon as previously described [9, 16, 40]. After 48 hours of transfection, cell lysates and supernatants were analyzed for protein expression by western blot, flow cytometry and ELISA. Plasmids coding for the gag-pol HIV- 1 genes (pCMV GAG-POL HIV University of Michigan), for shRNA of interest (pLKO.1 shRNA, Thermo Scientific) and for VSVG envelope (pMDG-VSV-G) were transfected into HEK293T cells using calcium phosphate reagent (Promega) to obtain lentiviral vector particles. After 48 hours, supernatants were filtered using 0.45-µm cellulose acetate filters (Sartorius stedim), aliquoted and stored at -80°C. Monocytic THP1 cells were transduced for 24 hours and grown in medium containing 1 µg/mL puromycin (Invivogen). Control THP1 (PLKO.1) cells and CASP1- (shRNA1 CASP1 and shRNA2 CASP1)-depleted THP1 cells were thus obtained. Sequences of human siRNA, si-GENOME SMARTpool and shRNA used in this study are shown in Table S1.

Virus, pseudoviral constructs and viral production

As previously published [16], the SARS-CoV-2 BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain (D614G) was obtained from Dr. Benoit Visseaux and Prof. Diane Descamps (UMR S 1135, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris), and from the National Reference Center For Respiratory Viruses (Institut Pasteur, Paris, France). Viral stocks (2x106 PFU/mL) were prepared by propagation in African green monkey kidney epithelial (Vero E6) cells as previously described [16]. Plasmid NLENG1-ES-IRES coding for defective virus carrying two stop codons in the reading frame of the enve-lope was derived from the HIV-1 virus NL4- 3 and used for the production of HIV-1NL4-3ΔEnv particles (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-LV), as previously published [16]. Supernatants containing the viruses were collected 48 hours after transfection, low-speed centrifuged, filtered, titrated using HIV-1 P24 ELISA assay (#NEK05001KT, Perkin Elmer) and stored at -80°C until use, as previously published [16].

Immunohistochemistry

Mouse lungs were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS, paraffin embedded and cut into 4-µm sections. Lung sections were then stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) and scanned using a microscopy virtual slide system (Olympus VS120).

Immunofluorescence

After SARS-CoV-2 infection or indicated treatment, epithelial cells (ACE2-A549, Caco-2, Vero E6 cells) and BMDMs were fixed for 15 minutes at room temperature with 4% PFA/PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (#X100, Sigma-Aldrich) for 15 minutes or 0.3% Triton X-100 for 5 minutes, respectively, and saturated with 5% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS (BSA/PBS) for 1 hour at room temperature. Cells were incubated with the following antibodies overnight at 4°C: anti-TMS1/ASC antibody (ASC) (#ab155970 rabbit, Abcam, 1/200 dilution), anti-spike (Spike) antibody (#GTX632604 mouse, Genetex, 1/100 dilution), anti-ASC antibody (ASC) (clone 2EI-7, #04-147 mouse, Millipore, 1/100 dilution) and anti-NLRP3/NALP3 (NLRP3) antibody (#MAB7578 rat, R&D Systems, 1/100 dilution) in 5% BSA/PBS. ACE2-A549 cells were incubated with anti-spike S antibody for 2 hours at room temperature and appropriate secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (#A11034, Invitrogen, 1/500) or Alexa Fluor 546 (#A11030, Invitrogen, 1/500) at room temperature for 1 hour. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (#1874027, Invitrogen, 1/1000 dilution). Then, cells were mounted with Fluoromount G medium (Southern biotech), analyzed and imaged by Leica DMi8 microscope using a 60X objective. For immunofluorescence analysis of mouse lungs, 4-µm sections were cut from the paraffin blocks of the PFA-fixed tissues from mice. After paraffin removal, slides were subjected to antigen retrieval by microwave boiling in 1 mmol/L EDTA pH 9.0. After permeabilization with 0.3% Triton (for 5 minutes) and saturation in PBS containing 20% FBS (for 1 hour), slides were stained with (green) TUNEL assay (#Roche, #11684809910) during 1 hour at 37°C according to the manufacturer's instructions and incubated with anti-CD40 (#14-0401, ebioscience) or anti-CASP1 p10 (#sc-22164, Santa Cruz) overnight at 4°C. Then, cells were incubated with anti-rat IgG conjugated to Alexa Fluor 546 (#A11081, Invitrogen) or anti-goat IgG conjugated to Alexa Fluor 647 (#A21447, Invitrogen) fluorochromes at room temperature for 1 hour and 30 minutes. Cells were analyzed by fluorescent confocal microscopy on Leica SPE (using a 63X objective). Z series of optical sections at 0.4-µm increments were acquired.

Flow cytometry

Lung macrophages were extracted from mice (using Lung Dissociation kit from Miltenyi Biotech) and analysed using LSRFortessa (BD) flow cytometer. Mice alveolar macrophages were analyzed using anti-CD11b (APC-Cy7) (#557657, BD Pharmingen), anti-CD11c (PE- Cy7) (#117318, BioLegend), anti-CD40 (eFluo710) (#46- 0401, ebioscience), anti-F4/80 (FITC) (#11-4801, ebioscience), and anti-Ly-6G (GR-1-PE) (#12-5931, ebioscience) antibodies and interstitial macrophages were identified using anti-CD45 (APC-Vio 770) (#130-110-662, Miltenyi),

anti-CD11b (BUV395) (#563553, BD Horizon), anti-Ly-6G (PerCP-Vio 700) (#130-117-500, Miltenyi), anti-Ly-6C (Alexa Fluor 700) (#128024, BioLegend) and anti-CD64 (BV605) (#139323, BioLegend) antibodies, as previously reported [25].

Western blots

Total cellular proteins were extracted from ACE2-A549, Caco-2 and Vero E6 cells in a lysis buffer containing 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 1 M HEPES, 1 M KCl, 10% glycerol and the protease and phosphatase inhibitors (Roche). For PMA-THP1 and BMDM cells, total cellular proteins were extracted in a lysis buffer containing 1M Tris-HCl (pH=7.4), 5M NaCl, 1% CHAPS and the protease and phosphatase inhibitors. 10-40 µg of protein extracts were run on 12% SDS-PAGE and transferred at 4°C onto 0.2 µm pore size nitrocellulose membrane. After 1 hour saturation at room temperature with 5% BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20 (TBS-Tween), nitrocellulose membranes were incubated with primary antibody at 4°C overnight and for 1 hour with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti–mouse or anti–rabbit (Southern Biotech) antibodies. Enhanced ECL detection system (GE Healthcare) was used for western blot revelation. For supernatant proteins, supernatants were centrifuged 5 min at 1500 RPM at 4°C and proteins were run on 4-12% SDS-PAGE. The primary antibody against Spike (#GTX632604) was from Genetex. Primary antibodies against IL-1β (#ab2105) and β-Actin-HRP (#ab49900) were purchased from Abcam. Anti-NLRP3 (Cryo-2, #AG-20B-0014), anti-Caspase-1 (CASP1) (#2225) and anti-GAPDH (clone 6C5, #MAB374) were from Adipogen, Cell Signaling and Millipore, respectively. Antibody for p24 was obtained through the NIH HIV Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH: Polyclonal Anti- Human Immunodeficiency Virus Type 1 SF2 p24 (antiserum, Rabbit), ARP-4250, contributed by DAIDS/NIAID; produced by BioMolecular Technologies).

Quantitative RT-PCR

Total cell RNA from SARS-CoV-2-infected cells was obtained using either QIAshredder kit (#79654, Qiagen) and the RNeasy kit plus Mini kit (#74134, Qiagen) or using NucleoSpin RNA Plus XS, Micro kit for RNA purification with DNA removal column (#740990.250, Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. RNA was submitted to reverse transcription before PCR amplification. Quantifications were performed by real-time PCR on a Light Cycler instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the second- derivative-maximum method provided by the Light Cycler quantification software (version 3.5 (Roche Diagnostics)) or using CFX Maestro (BioRad). Sequences of the oligonucleotides and probes used to quantify the RdRp, E gene and β-actin are given in Table S2. The amplification of RdRp and E genes was obtained after 5 minutes of reverse transcription, 5 minutes of denaturation and 45 to 50 cycles with the following steps (95°C during 5 seconds, 60°C during 15 seconds and 72°C during 15 seconds or 95°C for 15 seconds and 58°C for 30 seconds to 1 minute), as previously described [16]. The amplification of NLRP3 (Catalog #4331182 Assay ID Hs00918082_m1, ThermoFisher Scientific), PYCARD (ASC) (Catalog #4331182 Assay ID Hs01547324_gH, ThermoFisher Scien-

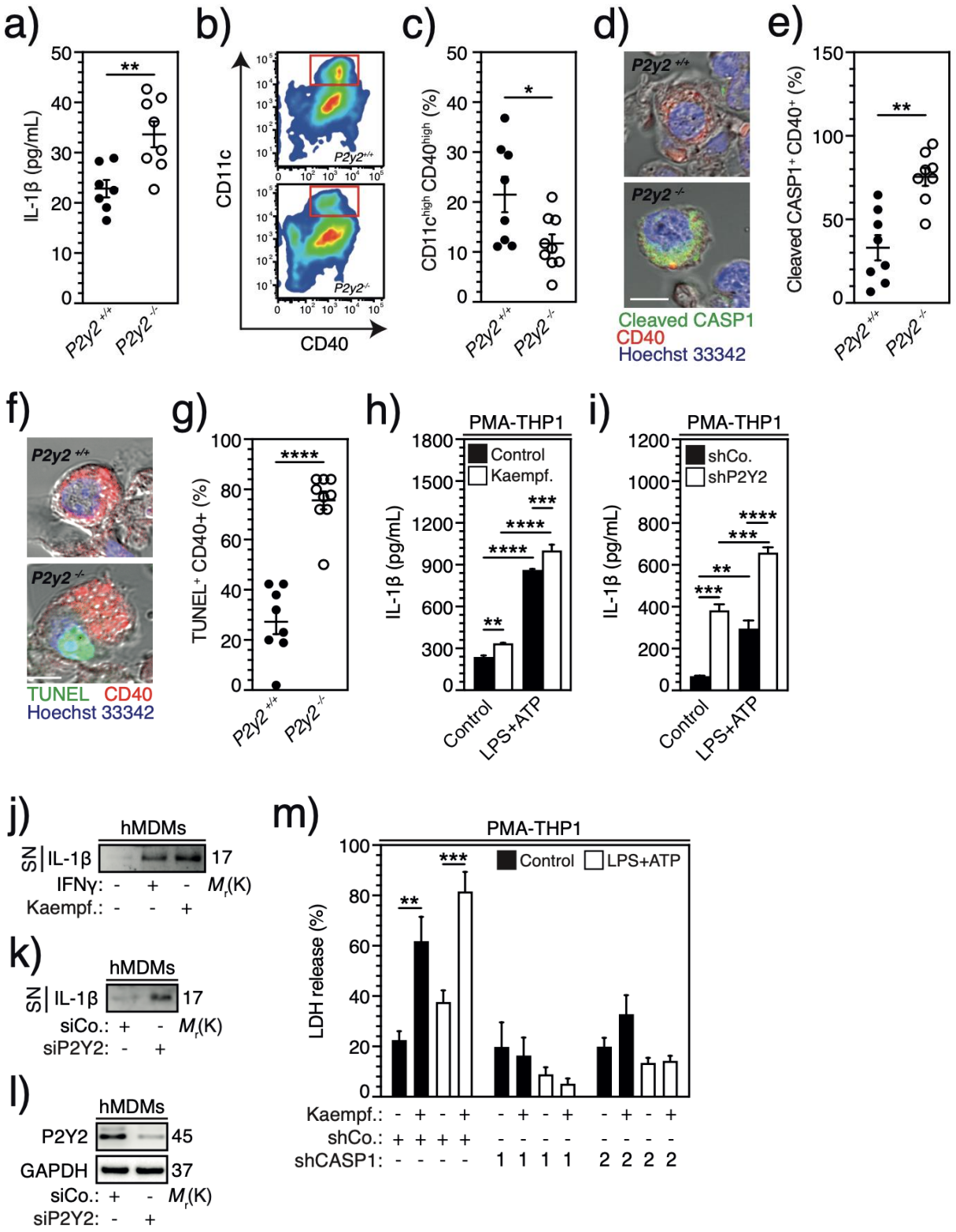
tific), CASP-1 (pro-CASP1) (Catalog #4331182 Assay ID Hs00354836_m1, ThermoFisher Scientific), IL1B (pro-IL-1β) (Catalog #4331182 Assay ID Hs01555410_m1, ThermoFisher Scientific) and ACTB (β-actin) (Catalog #4331182 Assay ID Hs01060665_g1, ThermoFisher Scientific) was obtained after 5 minutes at 65°C for annealing primer to the template RNA, 2 minutes at 50°C of reverse transcription, 10 minutes at 95°C of denaturation and 44 cycles with the following steps (95°C for 15 seconds and 60°C for 1 min). Data are presented as fold changes and were calculated with relative quantification of ΔCT obtained from quantitative RT-PCR.

Detection of cytokines release

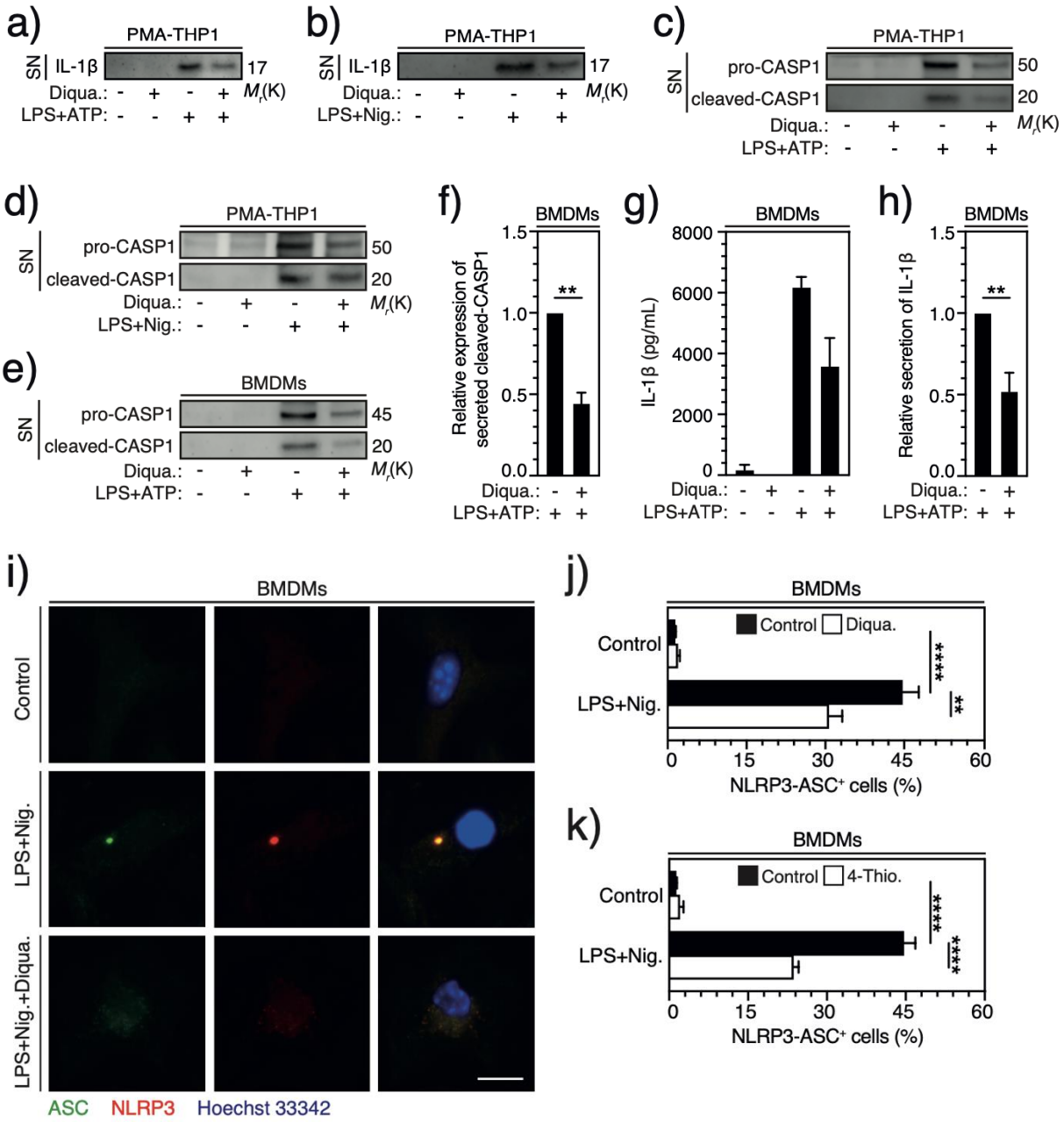
Plasma serum from P2y2+/+ and P2y2-/- mice and supernatants harvested from PMA- stimulated THP1 macrophages, hMDMs or BMDMs that were stimulated as indicated with LPS and Nigericin, or IFNγ, or LPS and ATP, and/or depleted for P2Y2, in presence or in absence of 100 µM Kaempferol, 100 µM Diquafosol or 100 µM 4-Thio-UTP at indicated times were analyzed using western blots or ELISA assays for IL-1β and IL-18 according to the manufacturers' instructions. IL-1β secretion from PMA-THP1 and hMDMs was detected using Human IL-1β ELISA Kit (#BMS224-2, Invitrogen), Mouse IL-1 beta ELISA Kit (#BMS6002, Invitrogen) was used for the detection of IL-1β secretion from mice plasma serum and BMDMs and Mouse IL-18 ELISA (#BMS618-3, Invitrogen) was used for the detection of IL-18 secretion from BMDMs.

Cell viability assays

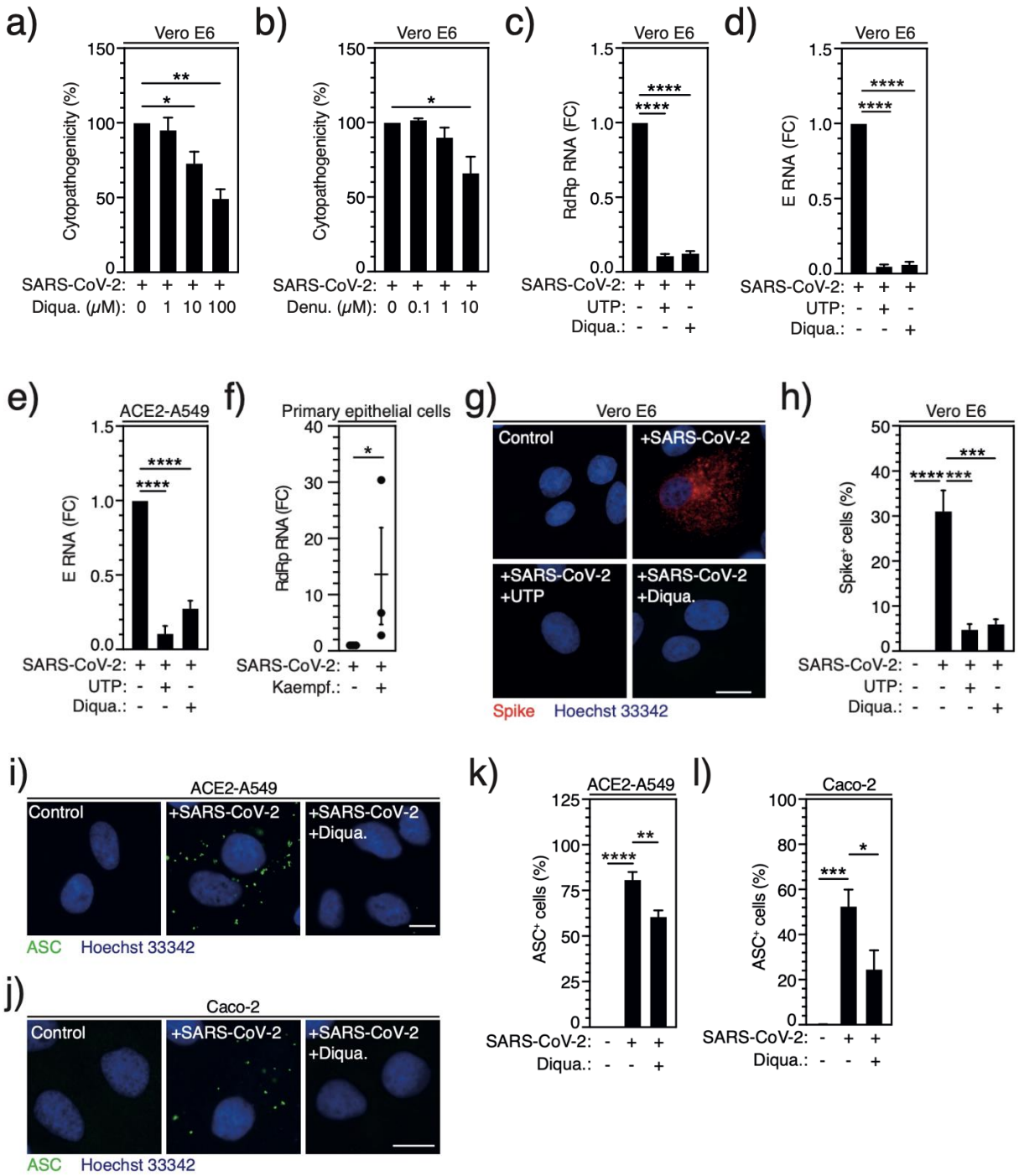
Vero E6 cells were treated with indicated concentrations of Diquafosol or Denufosol during 4 hours before infection and infected or not with SARS-CoV-2 (BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain) with a multiplicity of infection between 1 and 2. Cell viability was determined after 72 hours using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (#M5655, Sigma) following manufacturer's instructions. Cell viability was also measured in Vero E6 cells treated with the same compounds for 48 hours and in absence of infection using MTT assay. Human PMA-THP1 macrophages depleted or not for CASP1 were stimulated for 3 hours with ultrapure LPS from E. coli (10 ng/mL, Sigma) and for 6 hours with ATP (5 mM, Sigma) in presence or in absence of 100 µM Kaempferol and analyzed for LDH release using Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (#04744934001, Roche, Sigma-Aldrich).



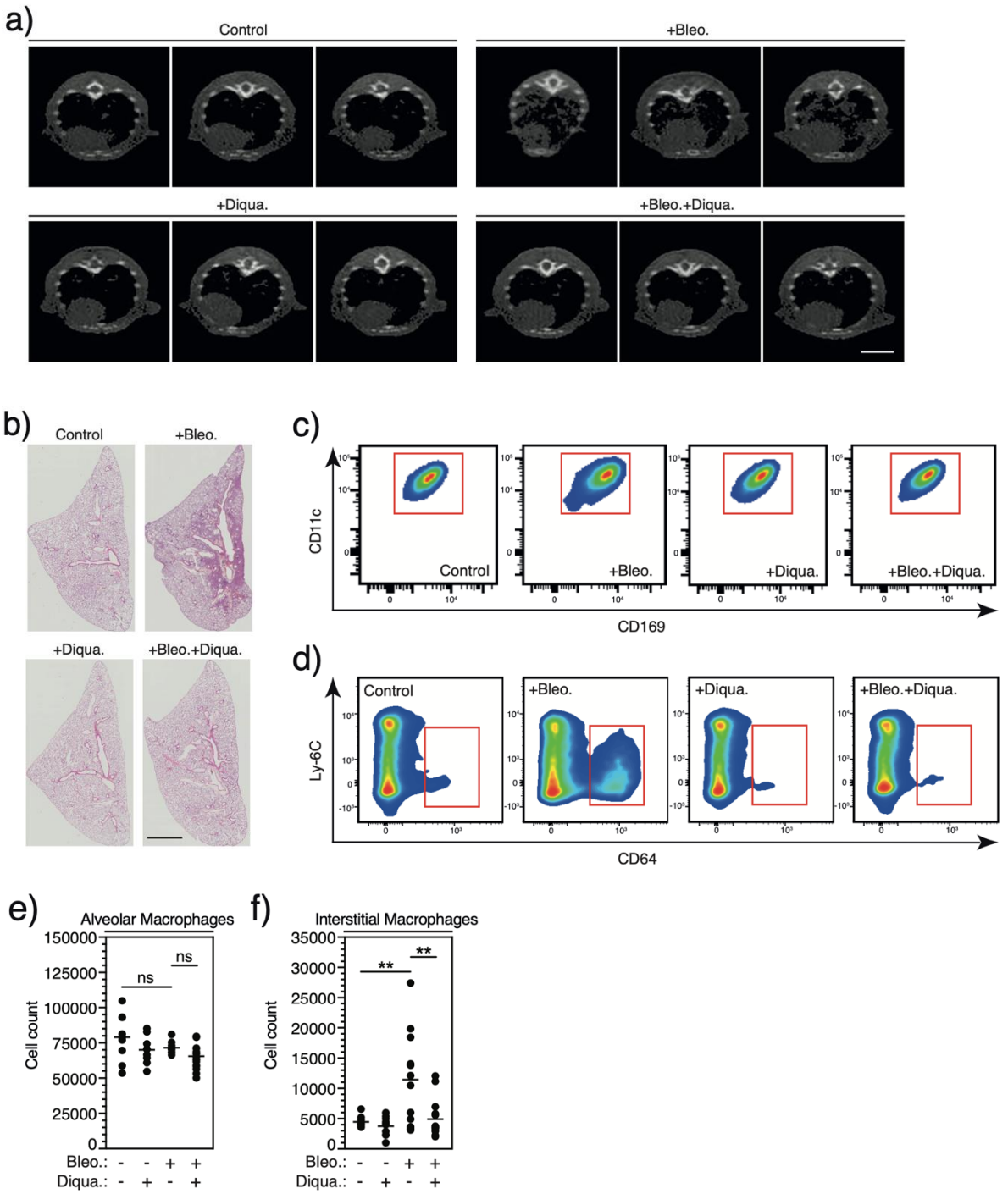
GUTIERREZ-MATEYRON#1



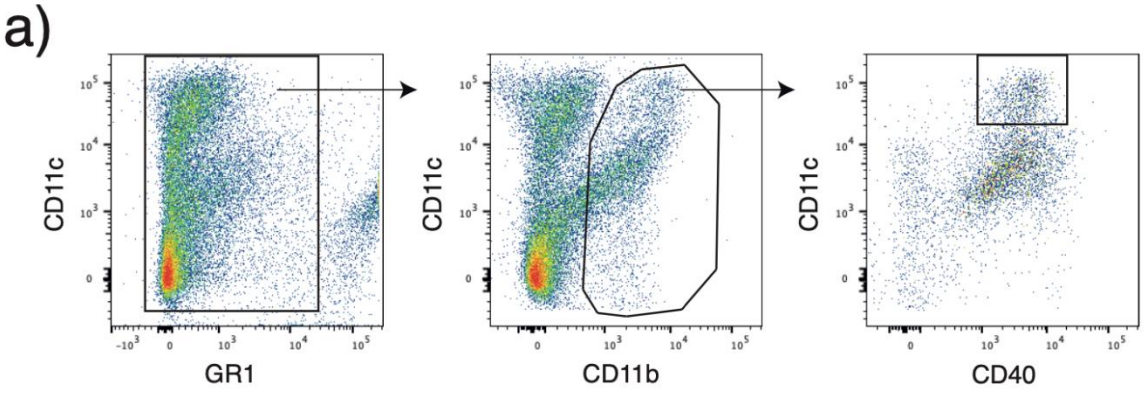
GUTIERREZ-MATEYRON#2



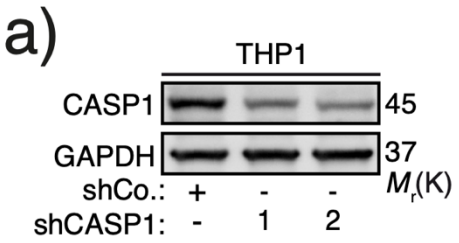
GUTIERREZ-MATEYRON#3



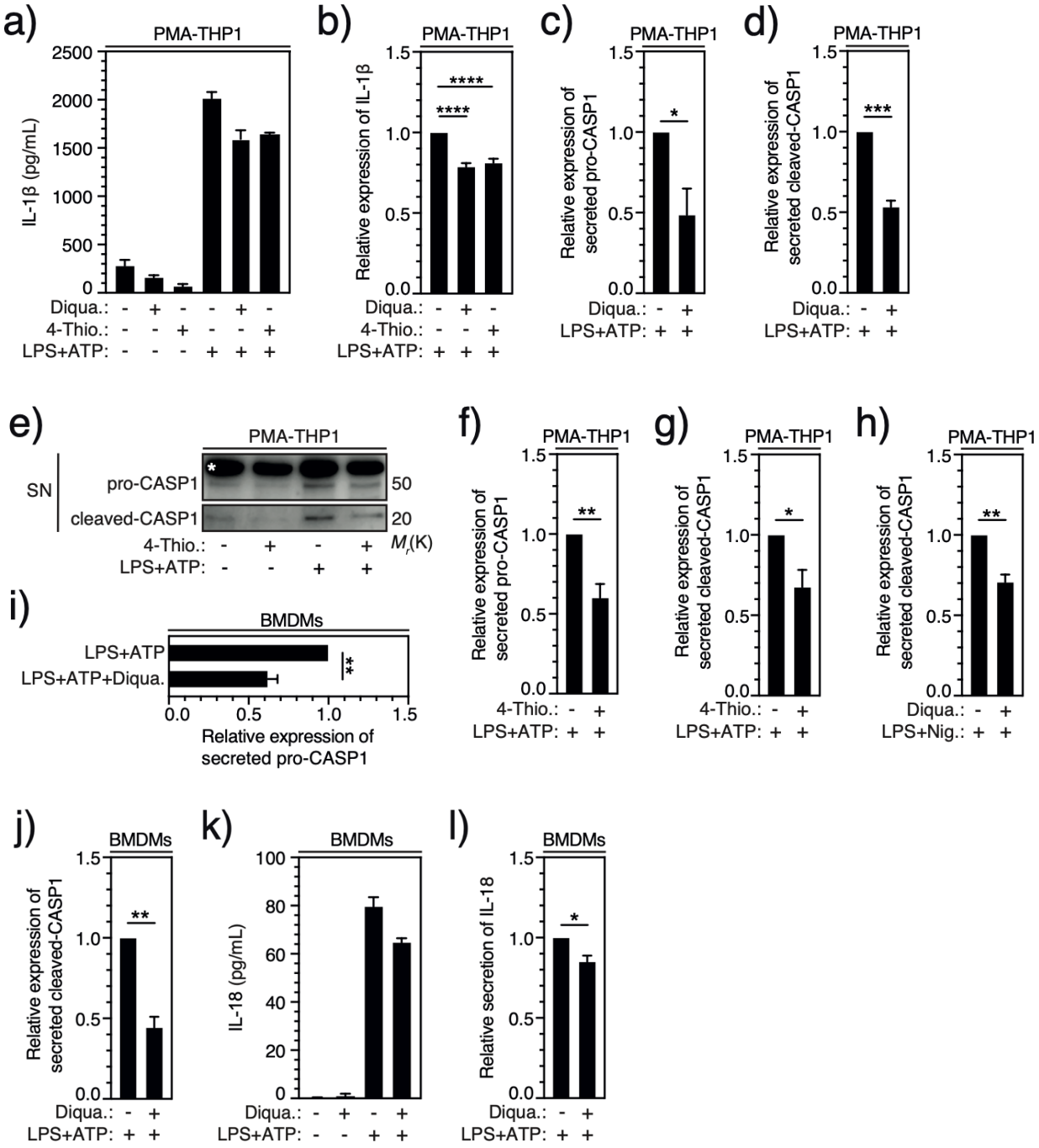
GUTIERREZ-MATEYRON#4



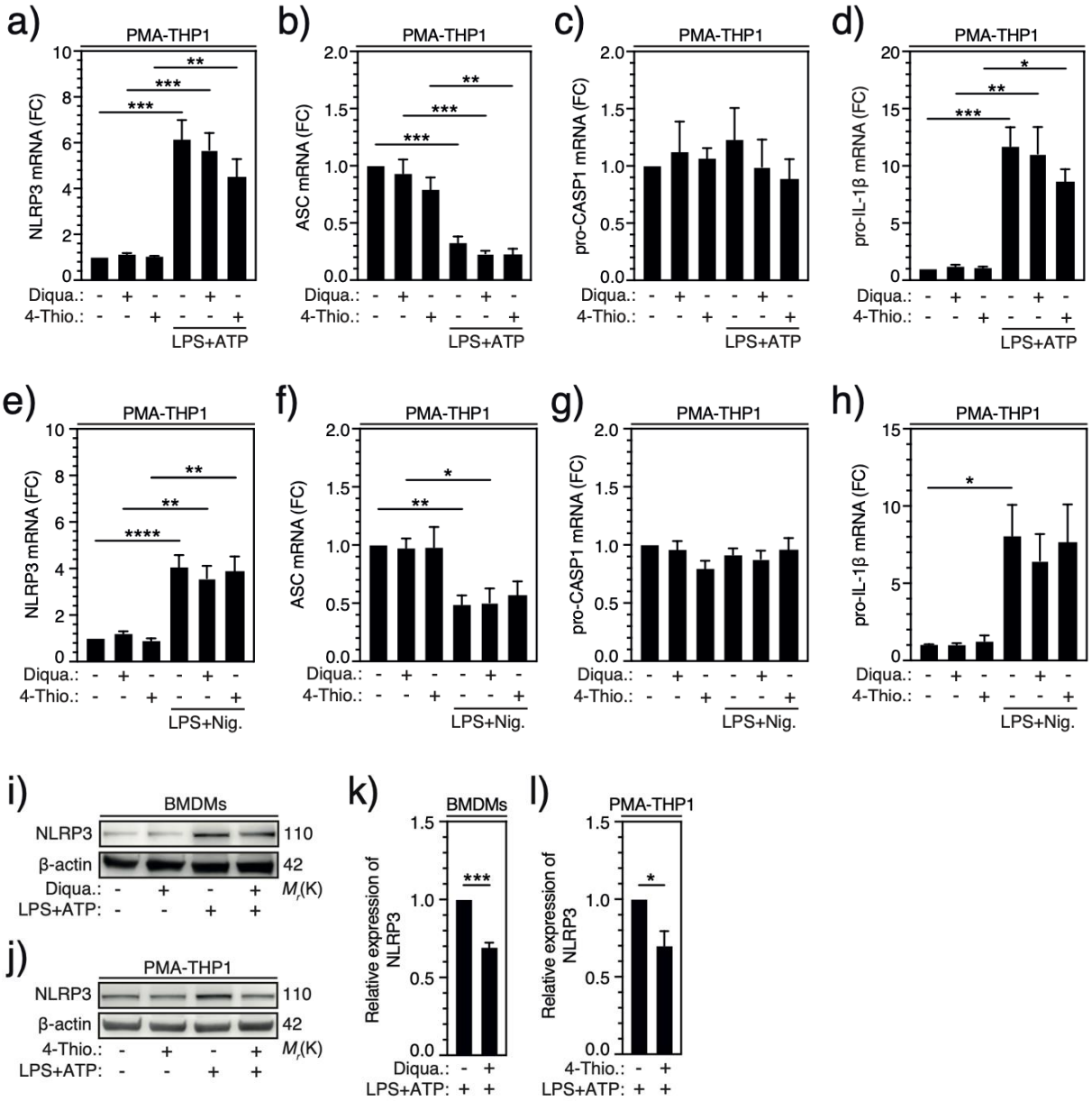
GUTIERREZ-MATEYRON#S1



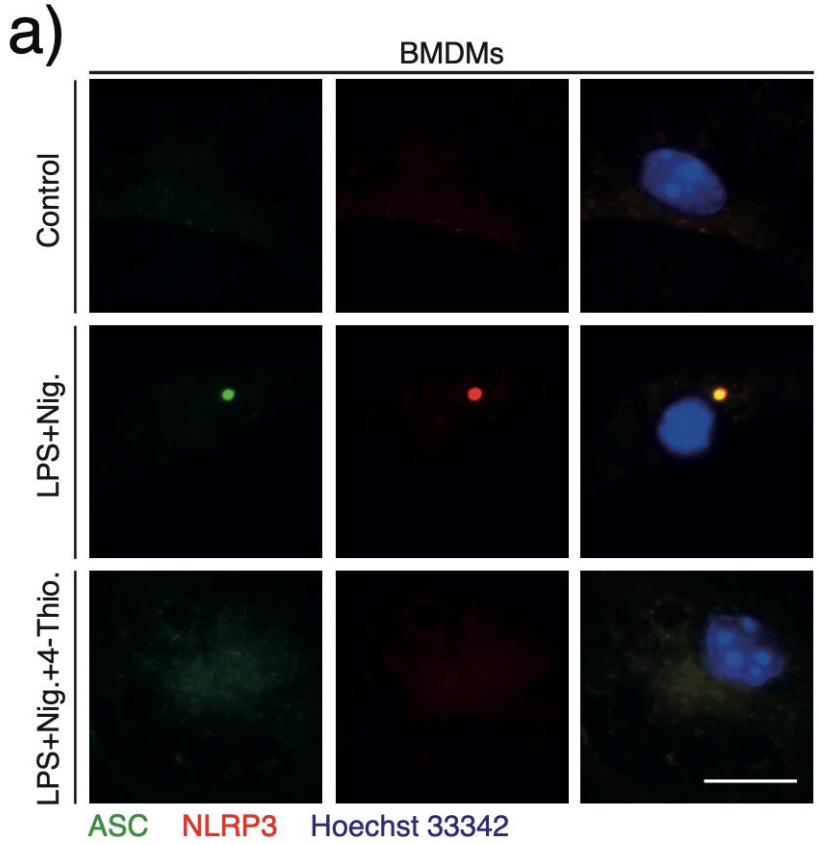
GUTIERREZ-MATEYRON#S2



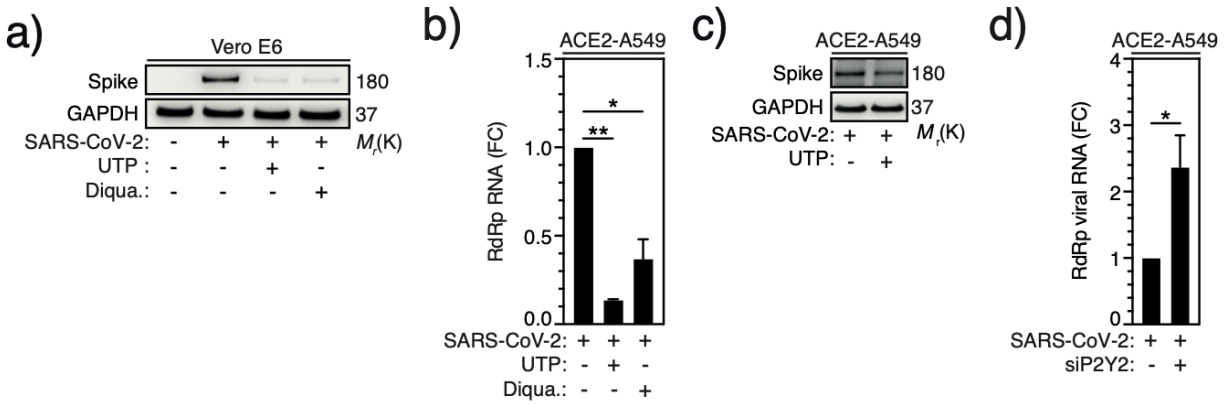
GUTIERREZ-MATEYRON#S3



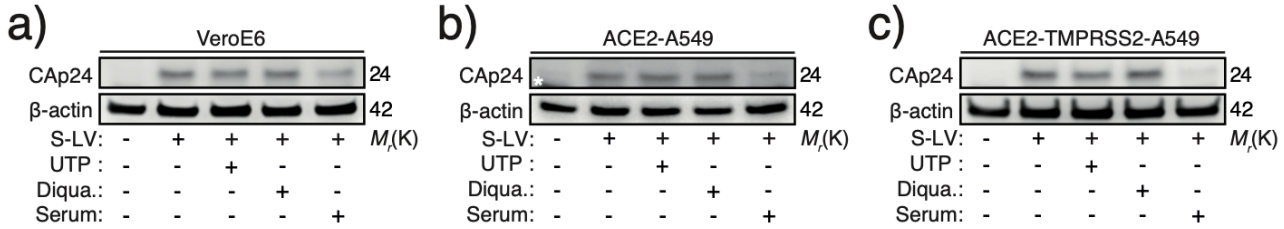
GUTIERREZ-MATEYRON#S4



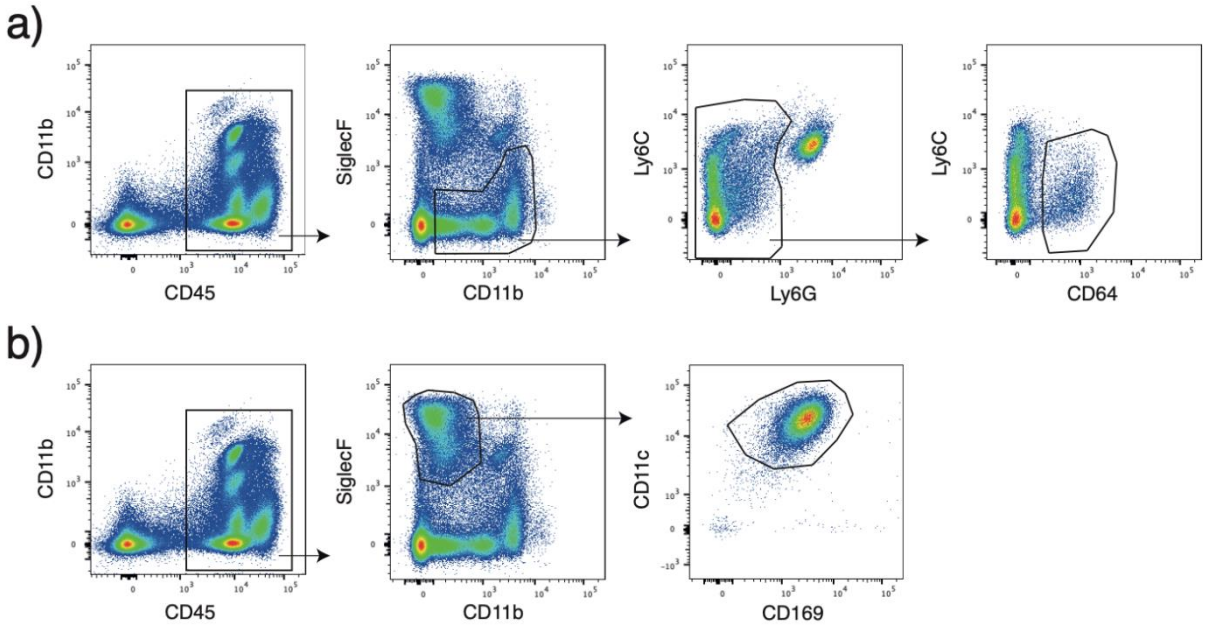
GUTIERREZ-MATEYRON#S5



GUTIERREZ-MATEYRON#S6



GUTIERREZ-MATEYRON#S7



GUTIERREZ-MATEYRON#S8

ANNEXE 2 : The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection.

frontiers | Frontiers in Immunology

TYPE Original Research
PUBLISHED 18 October 2023
DOI 10.3389/fimmu.2023.1270081

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Jagadeesh Bayry,
Indian Institute of Technology Palakkad,
India

REVIEWED BY
Talia H. Swartz,
Icahn School of Medicine at Mount Sinai,
United States
Thomas Witzig,
Mayo Clinic, United States

*CORRESPONDENCE
Jean-Luc Perfettini
jean-luc.perfettini@gustaveroussy.fr

RECEIVED 31 July 2023
ACCEPTED 04 October 2023
PUBLISHED 18 October 2023

CITATION
Lécuyer D, Nardacci R, Tannous D, Gutierrez-Mateyron E, Deva Nathan A, Subra F, Di Primio C, Quaranta P, Petit V, Richetta C, Mostefa-Kara A, Del Nonno F, Falasca L, Marlin R, Maisonnasse P, Delahousse J, Pascaud J, Deprez E, Naigeon M, Chaput N, Paci A, Saada V, Ghez D, Mariette X, Costa M, Pistello M, Allouch A, Delelis O, Piacentini M, Le Grand R and Perfettini J-L (2023) The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.* 14:1270081. doi: 10.3389/fimmu.2023.1270081

COPYRIGHT
© 2023 Lécuyer, Nardacci, Tannous, Gutierrez-Mateyron, Deva Nathan, Subra, Di Primio, Quaranta, Petit, Richetta, Mostefa-Kara, Del Nonno, Falasca, Marlin, Maisonnasse, Delahousse, Pascaud, Deprez, Naigeon, Chaput, Paci, Saada, Ghez, Mariette, Costa, Pistello, Allouch, Delelis, Piacentini, Le Grand and Perfettini. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

The purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome are druggable host factors required for SARS-CoV-2 infection

Déborah Lécuyer[1,2], Roberta Nardacci[3,4], Désirée Tannous[1,2,5], Emie Gutierrez-Mateyron[1,2], Aurélia Deva Nathan[1,2], Frédéric Subra[6], Cristina Di Primio[7,8], Paola Quaranta[7,9], Vanessa Petit[10], Clémence Richetta[6], Ali Mostefa-Kara[1,2], Franca Del Nonno[3], Laura Falasca[3], Romain Marlin[11], Pauline Maisonnasse[11], Julia Delahousse[1,2], Juliette Pascaud[11,12], Eric Deprez[6], Marie Naigeon[2,13,14], Nathalie Chaput[13,14,15], Angelo Paci[1,2,14,16], Véronique Saada[16], David Ghez[1,17], Xavier Mariette[11,12,18], Mario Costa[7,8,19], Mauro Pistello[9,20], Awatef Allouch[1,2,5], Olivier Delelis[6], Mauro Piacentini[3,21], Roger Le Grand[11] and Jean-Luc Perfettini[1,2*]

[1]Université Paris-Saclay, Inserm UMR1030, Laboratory of Molecular Radiotherapy and Therapeutic Innovation, Villejuif, France, [2]Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France, [3]National Institute for Infectious Diseases "Lazzaro Spallanzani", Rome, Italy, [4]UniCamillus - Saint Camillus International University of Health and Medical Sciences, Rome, Italy, [5]NH TherAguix SAS, Meylan, France, [6]Université Paris-Saclay, ENS Paris-Saclay, CNRS UMR 8113, IDA FR3242, Laboratory of Biology and Applied Pharmacology (LBPA), Gif-sur-Yvette, France, [7]Institute of Neuroscience, Italian National Research Council, Pisa, Italy, [8]Laboratory of Biology BIO@SNS, Scuola Normale Superiore, Pisa, Italy, [9]Retrovirus Center, Department of Translational Research, Universita of Pisa, Pisa, Italy, [10]Université Paris-Saclay, Inserm U1274, CEA, Genetic Stability, Stem Cells and Radiation, Fontenay-aux-Roses, France, [11]Université Paris-Saclay, Inserm, CEA, Center for Immunology of Viral, Auto-immune, Hematological and Bacterial Diseases (IMVA- HB/IDMIT), Fontenay-aux-Roses, France, [12]Assistance Publique, Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France, [13]Université Paris-Saclay, Inserm, CNRS, Analyse Moléculaire, Modélisation et Imagerie de la Maladie Cancéreuse, Laboratoire d'Immunomonitoring en Oncologie, Villejuif, France, [14]Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry, France, [15]Université Paris-Saclay, Gustave Roussy Cancer Center, CNRS, Stabilité Génétique et Oncogenèse, Villejuif, France, [16]Department of Biology and Pathology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France, [17]Department of Hematology, Gustave Roussy Cancer Center, Villejuif, France, [18]Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, France, [19]Centro Pisano Ricerca e Implementazione Clinical Flash Radiotherapy "CPFR@CISUP", "S. Chiara" Hospital, Pisa, Italy, [20]Virology Operative Unit, Pisa University Hospital, Pisa, Italy, [21]Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy

Purinergic receptors and NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome regulate inflammation and viral infection, but their effects on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection remain poorly understood. Here, we report that the purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome are cellular host factors required for SARS-CoV-2 infection. Lung autopsies from patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) reveal that NLRP3 expression is increased in host cellular targets of SARS-CoV-2 including alveolar macrophages, type II pneumocytes and syncytia arising

from the fusion of infected macrophages, thus suggesting a potential role of NLRP3 and associated signaling pathways to both inflammation and viral replication. *In vitro* studies demonstrate that NLRP3-dependent inflammasome activation is detected upon macrophage abortive infection. More importantly, a weak activation of NLRP3 inflammasome is also detected during the early steps of SARS-CoV-2 infection of epithelial cells and promotes the viral replication in these cells. Interestingly, the purinergic receptor P2X7, which is known to control NLRP3 inflammasome activation, also favors the replication of D614G and alpha SARS-CoV-2 variants. Altogether, our results reveal an unexpected relationship between the purinergic receptor P2X7, the NLRP3 inflammasome and the permissiveness to SARS-CoV-2 infection that offers novel opportunities for COVID-19 treatment.

KEYWORDS

NLRP3, inflammasome, P2X7, SARS-CoV-2, COVID-19

Introduction

The rapid worldwide spread of SARS-CoV-2 poses a global health emergency that has not been resolved. Despite the use of preventive COVID-19 vaccination, neutralizing monoclonal antibodies, steroid or IL-6-targeted treatment that drastically reduced the risk of severe symptoms and death due to SARS-CoV-2 infection (1–6), people who are vaccinated or treated, may still get infected with SARS-CoV-2. Thus, there is an urgent need to combine anti-inflammatory therapies with highly effective antivirals for treating COVID-19. Three antiviral compounds, remdesivir (7), molnupiravir (8, 9), and nirmatrelvir (10) were authorized by the US Food and Drug administration for an emergency use for the treatment of COVID-19 (https://www.fda.gov). These drugs are proposed as therapeutic options, alone or in combination with modifiers of inflammatory responses (such as tocilizumab (11) or the Janus kinase inhibitor baricitinib (12)) for patients suffering from severe COVID-19 or for those with high risk of severe disease progression. Nevertheless, selection pressures exerted by these antivirals in patients with prolonged infection have been shown to increase viral diversity, to lead to drug resistance and to favor the emergence of mutated variants (13). To prevent further massive outbreaks with emerging variants, a better understanding of mechanisms whereby SARS-CoV-2 hijacks cellular host factors for viral replication and dysregulates anti-viral immune responses is still required and should pave the way for the identification of novel cellular or viral targets, thus offering alternative therapeutic opportunities for SARS-CoV-2-infected patients.

The SARS-CoV-2 entry into host cells begins with the binding of viral spike (S) glycoprotein to angiotensin converting enzyme 2 (ACE-2) and triggers through two distinct pathways, the proteolytic cleavage of S glycoprotein by the serine protease TMPRSS2 at cell surface or by cathepsin B/L in the host cell endosomes (14–16). This process ultimately allows the fusion of viral membranes with host cellular membranes (15, 17) and leads to viral RNA release into host cytosol, to the viral replication using specialized enzymes (such as RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (18)), to viral structural protein expression (such as E and S proteins), and finally, to the assembly and release of the viral progeny (19). Host factors (such as RAB7A, p38MAPK, CK2, AXL and PIFFYVE kinases) are involved in the regulation of early and late steps of SARS-CoV-2 infection (20, 21), but the host cellular pathways used by SARS-CoV-2 to establish a viral infection are still poorly understood. Even though SARS-CoV-2-infected people are mainly asymptomatic or exhibit mild to moderate symptoms, approximately 15% of patients experience severe disease with atypical pneumonia and 5% develop an acute respiratory distress syndrome (ARDS) and/or multiple organ failure that is associated with a high mortality rate (around 20-30%) (22). Studies of COVID-19 patients with severe disease revealed a high level of plasma pro-inflammatory cytokines (including IL-1β, IL-6, IL-10, IL-18 and TNF) (23) and lactate dehydrogenase (LDH) (24), indicating overt hyper-inflammation during COVID-19, sometimes improperly termed "cytokine storm" or "cytokine release syndrome". Until now, few molecular mechanisms driving COVID-19 associated hyper-inflammation have been identified and proposed to explain COVID-19 pathogenesis.

SARS-CoV-2 infection activates several microbe-sensing receptors called pattern recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs), RIG-I-like receptors (RLRs) and C-Type lectin receptors (CLRs). Their activations lead to antiviral immune responses driven by the nuclear factor NF-κB, type I interferon secretion and interferon stimulated genes (ISGs) expression (25). Among those PRRs, nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing receptor (NLRs) proteins were widely found to be involved in SARS-CoV-2-mediated hyper-inflammation. NLR proteins and purinergic (P2) receptors are the main germline-encoded pattern recognition receptors regulating the secretion of IL-1 family members in response to microbial infection, inflammation, and inflammatory diseases. Upon

activation, NLR protein 3 (NLRP3), which is the most studied NLR protein (26), forms large complexes with the adaptor protein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain), called inflammasomes, which activate caspase-1, induce the release of mature cytokines IL-1β and IL-18 (26, 27) and can lead to the inflammatory cell death of stimulated, stressed or infected host cells, which is also known as pyroptosis (28). High levels of IL-1β, IL-18 and LDH positively correlate with disease severity in COVID-19 patients (29), suggesting that inflammasomes participate in SARS-CoV-2 pathogenesis. More recently, NLRP3 inflammasome was found activated in response to SARS-CoV-2 infection and identified as critical driver of COVID-19 (30–33). In addition, SARS-CoV-2 viral proteins such as viral spike (S) glycoprotein (34), SARS-CoV open reading frame-8b (ORF8b) (35), the transmembrane pore-forming viral Viroporin 3a (also known as SARS-COV 3a) (36) and the viral N protein (37) were shown to activate the NLRP3 inflammasome, thus revealing that NLRP3 inflammasome is potentially an interesting molecular target for the treatment of COVID-19. Purinergic receptors are membrane-bound innate receptors that bind extracellular nucleotides (such as adenosine triphosphate (ATP)), and control numerous cellular functions (such as cytokine secretion and migration) mainly in immune cells, but also on other cell types that are involved in SARS-CoV-2 pathogenesis such as type 1 and 2 pneumocytes, endothelial cells, platelets, cardiomyocytes and kidney cells (38, 39). Purinergic P2 receptors are divided into two families, the ionotropic P2X receptors and the metabotropic P2Y receptors, which can regulate the NLRP3 inflammasome (39–41). P2X7 activation was extensively shown to control NLRP3 inflammasome activation and cytokine release in response to danger signals (42). We previously revealed that purinergic receptors (such as P2Y2 and P2X7), NLRP3 inflammasome and associated signaling pathways also control viral replication through the modulation of the fusogenic activity of HIV-1 envelope (41, 43, 44) or the pre-integrative steps of HIV-1 life cycle (45). The contribution of purinergic receptors to viral infection has been confirmed with other purinergic receptors and with several viruses (such as human cytomegalovirus and hepatitis B, C and D viruses) (46). In this context, we hypothesized that the purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome activation could contribute to SARS-CoV-2 pathogenesis and thus, the therapeutic modulation of P2X7 and NLRP3 could regulate the permissiveness of host cells to SARS-CoV-2 infection.

Materials and methods

Cell lines

The African green monkey kidney Vero E6 cells were purchased from ATCC (ATCC CRL-1587), ACE2-overexpressing A549 (ACE2-A549) cells were a gift from Dr. Olivier Schwartz (Institut Pasteur, France), ACE2 and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing A549 (ACE2-TMPRSS2-A549) cells were from Invivogen (#a549-hace2tpsa) and HEK293T cells were from ATCC (#CRL-11268, #CRL3216). These cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 UI/ml penicillin (Life technology), and 100 µg/ml streptomycin (Life technology) at 37°C. Caco-2 cells were kindly provided by Pr. Guido Kroemer (Gustave Roussy, France) and were cultured in EMEM (30-2003, ATCC) with 20% heat inactivated FBS, 100 UI/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C. Monocyte THP1 cells (TIB2002, ATCC) were differentiated in macrophages with phorbol-12 myristate-13-acetate (PMA) (#tlrl-pma, Invivogen), as previously described (47) and maintained in RMPI-1640-Glutamax medium supplemented with 10% heat inactivated FBS, 100 UI/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. All cell lines used were mycoplasma-free.

Primary cells

Minor salivary gland biopsy specimens were obtained from patients referred for suspected primary Sjögren's syndrome diagnosis to the rheumatology department of Bicêtre Hospital (AP-HP, Université Paris-Saclay). The subjects selected for this study were patients who presented with sicca symptoms but without any autoantibodies and with normal or subnormal minor salivary gland findings (i.e., focus score <1), and thus were considered as controls. Primary cultures of salivary gland epithelial cells were established from minor salivary glands based on previously described protocol (48). Briefly, the minor salivary gland biopsy was cut into small fragments, which were placed in 75-cm² flasks (BD Falcon) (prehydrated with 3 ml of s-BEM medium during 30 minutes at 37°C) with 1 ml of s-BEM medium. The supplemented-Basal Epithelial Medium (s-BEM) consisted of 3:1 mix of Ham's F12 (Gibco, Life Technologies, UK) and DMEM (Gibco, Life Technologies, UK), supplemented with 2.5% FBS (PAN BIOTECH, Aidenbach, Germany), 10 ng/ml epidermal growth factor (EGF) (Gibco), 0.4 µg/ml hydrocortisone (Upjohn 100mg SERB), 0.5 µg/ml insulin (Novo Nordisk, Novorapid Flexpen) and 1X penicillin/streptomycin (LONZA, Verviers, Belgium). The flasks were incubated at 37°C with 5% CO_2 in a humidified incubator. The day after, 3ml of s-BEM were added slowly in the flasks. At day 6, 5 ml of s-BEM were added. Then, cultures were fed with fresh medium twice a week. After biopsy, 2-3 small pieces were seeded into T75 flask and cultured in a DMEM-F12 medium supplemented with 2.5% FBS, 100 UI/ml penicillin/streptomycin, 0.4 µg/ml hydrocortisone, 0.5 µg/ml insulin and 10 ng/ml EGF. Once tissues had expended, cells were harvested and $1x10^5$ cells per well were plated in 48-well plates that were pretreated with collagen for 1 hour at 37°C. Twenty-four hours later, cells were treated with OxATP and infected with SARS-CoV-2 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.5 for 48 hours. Cellular RNA was collected and extracted with NucleoSpin RNA Plus XS, Micro kit for RNA purification with DNA removal column (#740990.250, Macherey-Nagel), according to manufacturer instructions. Samples were then subjected to reverse transcription and PCR using probes against RdRp and β-actin. Data were normalized to β-actin and to control condition following the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Human autopsies and patients' serum

Human autopsies were performed after ethics committee approval (n° 9/2020) at the National Institute for Infectious Diseases Lazzaro Spallanzani-IRCCS Hospital (Rome, Italy), according to guidance for post-mortem collection and submission of specimens and biosafety practices (CDC March 2020, Interim Guidance and (49)) to reduce the risk of transmission of infectious pathogens during and after the post-mortem examination. Autopsies were performed in accordance with the law owing to the unknown cause of death, and to both scientific and public interest in a pandemic novel disease. Post-mortem lung sections were obtained from 3 non-COVID-19 patients and 7 COVID-19 patients with severe disease. Controls (n=3) were patients deceased after hemorragia, cardiorespiratory failure or interstitial pneumonia associated with pulmonary capillaritis. All COVID-19 patients (n=7) deceased after cardiorespiratory failure and exhibited in their vast majority diffuse alveolar damage (n=6) or fibrosis (n=1). Detection of SARS-CoV-2 was performed by RT-PCR on all patients using nasopharyngeal swabs. Convalescent COVID-19 serum was obtained from patients that received three doses of COVID-19 mRNA vaccine (Pfizer). Serum was collected one month after the last injection. All patients had a titer > 40 000 units/ml. The serum was obtained from Dr. Samuel Lebourgeois and Dr. Nadhira Houhou-Fidouh (Hôpital Bichat Claude Bernard, France).

Virus, pseudoviral constructs and viral production

The SARS-CoV-2 BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain (D614G) was provided by Dr. Benoit Visseaux from the group of Prof. Diane Descamps (UMR S 1135, Hôpital Bichat Claude Bernard, Paris) and by the National Reference Center For Respiratory Viruses (Institut Pasteur, Paris, France). The SARS-CoV-2 Alpha variant (lineage B1.1.7) was obtained from Pr. Mauro Pistello. Viral stocks were prepared by propagation in African green monkey kidney epithelial (Vero E6) cells in a biosafety level-3 (BLS-3) laboratory and titrated using lysis plaque assay as previously described (50). SARS-CoV-2 stock titer was $2x10^6$ PFU/ml. After 72 hours of infection, the supernatant was centrifuged at 1500 rpm, 12° C, for 5 minutes to remove dead cells and then centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes at 12°C. Supernatant was then aliquoted and stored at -80°C. For the production of green fluorescent protein (GFP)-tagged HIV-1NL4-$3_{\Delta env}$ variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-GFP-LV), the plasmid NLENG1-ES-IRES coding for defective virus carrying two stop codons in the reading frame of the envelope and expressing the fluorescent reporter gene EGFP (GFP) was derived from the HIV-1 virus NL4-3 as previously published (51). Envelope defective virus was pseudotyped with HU-1 SARS-CoV-2 Spike protein (pLV-Spike, Invivogen) and used for single round infection assays. To produce viral stocks, 293T cells were transfected with virus-encoding plasmids by the calcium phosphate method. Briefly, 293T cells were transfected using 20 µg of NLENG1-ES-IRES and 4 µg of the corresponding plasmid encoding spike (S) envelop. Two days post-transfection, supernatants containing the viruses were submitted to a low-speed centrifugation step, filtered through a 0.45-µm low-protein-binding Durapore filter (Millipore), and stored at -80°C until use. Viral stocks were titrated using HIV-1 P24 ELISA assay (#NEK05001KT, Perkin Elmer) and the concentration was 200 ng/ml.

Viral infections

Vero E6 cells, ACE2-TMPRSS2-A549, ACE2-A549 and Caco-2 cells were infected during indicated times with SARS-CoV-2 (BetaCoV/France/IDF0372/2020) at a MOI from 0.1 to 0.2 for qPCR experiments, MOI of 0.1 or 2 for WB experiments, and from MOI 1 to 2 for cytopathogenic analyses, in absence or in presence of 50 µM pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS) (#P178, Sigma-Aldrich), 100 µM oxidized ATP (OxATP) (#A6779, Sigma-Aldrich), 100 µM 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) (#B6396, Sigma-Aldrich), 20 µM MCC950 (#inh-mcc, InvivoGen), 100 µM Tranilast (S-1439, DIVBIOSCIENCE) or 100 µM Ac-YVAD-cmk (#inh-yvad, InvivoGen), unless stated otherwise. The virus was also neutralized by mixing 1 µL of convalescent COVID-19 serum with 30 µl of virus for 40 minutes at room temperature, before added to the cells and incubated for 48 hours at 37°C. As previously described, primary salivary gland epithelial cells were obtained and infected in 48-wells and with SARS-CoV-2 at MOI 0.5 for 48 hours. For viral yielding experiment, Huh7 cells were inoculated with SARS-CoV-2 Alpha variant (lineage B1.1.7) at MOI 0.001 for 3 hours. Then, the viral inoculum was removed and cells were gently washed with ice-cold phosphate buffer saline (PBS). Fresh cell culture medium was added and cells were incubated for 24 hours. Supernatants were then collected and the viral RNA was extracted by automated RNA extractor EZ1 (Quiagen) and quantified using quantitative RT-PCR.

RNA interference

The small interfering RNAs (siRNAs) against NLRP3 (siNLRP3) (5'- UGCAAGAUCUCUCAGCAAA-3') and the corresponding control siRNAs (siControl) (5'- UUCAAUAAAUUCUUGAGGU-5') were synthesized from Sigma. The siGenome smart pool siRNAs and siON-Target plus siRNAs were purchased from Dharmacon and are composed of a pool of four siRNAs. Sequences of indicated siRNAs are following: siGenome smart pool siRNAs against CASP-1 (siCASP-1, #M-004401-03-0010): (1) 5'-GACUCAUUGAACAUAUGCA-3', (2) 5'-AGACAUCCCACAAUGGGCU-3', (3) 5'-GAAUAUGC CUGUUCCUGUG-3', (4) 5'-CCGCAAGGUUCGAUUUUCA-3', siGenome smart pool non-targeting siRNAs (siCo., #D-001206-14-05): (1) 5'-UAAGGCUAUGAAGAGAUAC-3', (2) 5'-AUGUAU UGGCCUGUAUUAG-3', (3) 5'-AUGAACGUGAAUUGCUCAA-3', (4) 5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3', siON-Target plus siRNAs against P2X7 (siP2X7, #L-003728-00-0005): (1) 5'-GCGGUU GUGUCCCGAGUAU-3', (2) 5'-GGAUCCAGAGCAUGAAUUA-3', (3) 5'-GCUUUGCUCUGGUGAGUGA-3', (4) 5'-GGAUAG

CAGAGGUGAAAGA-3', and the siON-Target plus non-targeting siRNAs (siCo., #D-001810-10-20): (1) 5'-UGGUUU ACAUGUCGACUAA-3', (2) 5'-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3', (3) 5'-UGGUUUACAUGUUUUCUGA-3', (4) 5'-UGGUUUAC AUGUUUUCCUA-3'. Cells were seeded (10^5 cells/well of 12 well-plate) and let be attached for 4 hours before siRNAs transfection. The siRNAs transfections were performed using lipofectamine RNAimax (#13778075, ThermoFisher Scientific) and OptiMEM (#31985-062, ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. After 48 hours of transfection, cell were infected and analyzed for gene expression (by RT-PCR) or protein expression (by western blot).

LentiCRISPR targeting

The generation of NLRP3-depleted THP1 cell line (CrNLRP3) was performed with two predesigned and validated CRISPR NLRP3 gRNAs (52) (gRNA1: CGAAGCAGCACTCATGCGAG; gRNA2: GTCTGATTCCGAAGTCACCG) which were cloned into the pLentiCRISPR v2 lentiviral vector expressing *CAS9* gene (GenScript). The control THP1 cell line (CrCo.) was obtained with the empty pLentiCRISPR v2 lentiviral vector. For the production of the lentiviral vectors (LentiCRISPR v2, LentiCRISPR v2-gRNA1-NLRP3 and LentiCRISPR v2-gRNA2-NLRP3), $10x10^6$ HEK293T (ATCC#CRL-3216) cells in a T300 flask and 20 ml DMEM medium (Gibco, #31966-021) (containing 2% heat inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) were transfected with 8 µg pDM2-VSV-G, 20 µg pΔ8.91 packaging and 16 µg lentiviral vector plasmid using Fugene (Promega, #E2312) according manufacturer's instructions. After 24 hours of transfection, cell supernatants were removed and replaced by 20 ml fresh DMEM medium (containing 2% heat inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin) for additional 96 hours. The viral stocks in the cell supernatants were then harvested, filtered through a 0.45-µm-pore size filter and quantified for viral Cap24 content using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Perkin Elmer, # NEK050A) as previously published (45, 53). CrCo. THP1 cells ($1x10^6$) were transduced with 10 µg Cap24 LentiCRISPR v2 lentiviral vector and CrNLRP3 THP1 cells ($1x10^6$) were transduced with 5 µg Cap24 of each lentiviral vector (LentiCRISPR v2-gRNA1-NLRP3 and LentiCRISPR v2-gRNA2-NLRP3). Transductions were performed in the presence of 5 µg/ml polybrene (Sigma, #H9268) by 2-hour spinoculation (1200 g at 25°C) and 2-hour incubation at 37°C. Then, THP1 cells were washed and cultured for 72 hours after transduction before puromycin (InvivoGen, #ant-pr) selection (0.5 µg/ml) and validation of NLRP3 depletion by western blot analysis and qPCR.

Immunofluorescence

Cells were fixed for 20 minutes with 4% paraformaldehyde-PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 (#X100, Sigma-Aldrich) for 15 minutes and incubated with 5% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS for 1 hour at room temperature. After saturation, cells were incubated overnight at 4°C with anti-TMS1/ASC antibody (ASC) (#ab155970 rabbit, Abcam, 1/200 dilution) or anti-spike (S) antibody (#GTX632604 mouse, Genetex, 1/100 dilution) in PBS-BSA 5%. Then, cells were incubated with appropriate secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (#A11034, Invitrogen, 1/500) or Alexa Fluor 546 (#A11030, Invitrogen, 1/500) at room temperature for 1 hour. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (#1874027, Invitrogen, 1/1000 dilution) for 30 minutes at room temperature. After three PBS washes, cells were mounted with Fluoromount G medium (Southern biotech). Cells were analyzed and imaged by Leica Dmi8 microscope using a 60X objective.

Western blots

Total cellular proteins were extracted in a lysis buffer containing 1% NP-40, 0.5 M EDTA, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1% glycerol and the protease and phosphatase inhibitors (Roche). 10-40 µg of protein extracts were run on 4–12% SDS-PAGE and transferred at 4°C onto a nitrocellulose membrane (0.2 micron). After 1 hour saturation at room temperature with 5% BSA in Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20 (TBS-Tween), nitrocellulose membranes were incubated with primary antibody at 4°C overnight. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti–mouse or anti–rabbit (SouthernBiotech) antibodies were then incubated for 1 hour and revealed with the enhanced ECL detection system (GE Healthcare). The primary antibody against P2X7 (#APR-004) was obtained from Alomone laboratories. Primary antibodies against ACE2 (#AF933) and Spike (S) (#GTX632604) were from R&D Systems and Genetex, respectively. Primary antibody against β-Actin-HRP (#ab49900) was purchased from Abcam. Anti-NLRP3 (Cryo-2, #AG-20B-0014) was from Adipogen. P24 antibody was obtained through the NIH HIV Reagent Program (Division of AIDS, NIAID, NIH: Polyclonal Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 SF2 p24 (antiserum, rabbit), ARP-4250, contributed by DAIDS/NIAID; produced by BioMolecular Technologies).

Flow cytometry

Control, treated-ACE2-A549 and treated-Vero E6 cells were harvested in DMEM medium, washed three times in PBS and saturated with 2% PBS-BSA at 4°C for 20 minutes. Primary anti-human ACE-2 antibody (#AF933, R&D systems) or isotype-matched antibody (#AB-108-C, R&D systems) was incubated at 0.2 µg/10^6 cells for ACE2-A549 and at 0.4 µg/10^6 cells for Vero E6 cells during 30 minutes at room temperature in 2% PBS-BSA. Cells were washed three times with 2% PBS-BSA and incubated with secondary anti-goat IgG (H+L) APC-conjugated antibody (F0108, R&D systems) in 2% PBS-BSA for 20 minutes at room temperature at 0.05 µg/10^6 cells for ACE2-A549 cells or at 0.1 µg/10^6 cells for Vero E6 cells. Cells were then washed three times with 2% PBS-BSA, resuspended in 200 µl 2% PBS-BSA and analyzed for mean fluorescence intensity (MFI) of ACE2 expression with CytoFLEX flow cytometer (Beckman). To determine the biological effects of

the purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome on viral entry, Vero E6 cells, ACE2-A549 cells and ACE2-TMPRSS2-A549 cells were pretreated for 4 hours with indicated drugs and infected for 24 hours with Spike-GFP-LVs. As negative control, Spike-GFP-LVs were preincubated with convalescent COVID19 patient's serum during 40 minutes at room temperature. After extensive washes, cells were incubated in complete medium for 24 hours, fixed with 4% PFA and GFP-positive cells were analyzed using BD FACSCelesta flow cytometer (BD Biosciences).

Quantitative RT-PCR

After infection, total cell RNA was extracted using either QIAshredder kit (#79654, Qiagen) and the RNeasy kit plus Mini kit (#74134, Qiagen) or using NucleoSpin RNA Plus XS, Micro kit for RNA purification with DNA removal column (#740990.250, Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. RNA was first submitted to reverse transcription before PCR amplification. Quantifications were performed by real-time PCR on a Light Cycler instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the second-derivative-maximum method provided by the Light Cycler quantification software (version 3.5 (Roche Diagnostics)) or using CFX Maestro (BioRad). Standard curves for SARS-CoV-2 RNA quantifications were provided in the quantification kit and were generated by amplification of serial dilutions of the provided positive control. Sequences of the oligonucleotides and probes used to quantify the RdRp (F: 5'-GGTAACTGGTATGATTT-3'; R: 5'-CTGGTCAAGGTTAATATA-3'; Probe: 5'-[FAM]TCATACAAACCACGCCAGG[BHQ1]-3'), E gene (F: 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'; R: 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3'; Probe: 5'-[FAM]CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC[BBQ]-3') and β-actin (F 5'- CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'; R 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'; SYBR-Green) are respectively obtained from Eurofins, TIB MolBiol or Origene (NM_001101). The amplification of RdRp and E genes was obtained after 5 minutes of reverse transcription, 5 minutes of denaturation and 45 to 50 cycles with the following steps (95°C during 5 seconds, 60°C during 15 seconds and 72°C during 15 seconds or 95°C for 15 seconds and 58°C for 30 seconds to 1 minute). The amplification of CASP-1 (Catalog #4331182 Assay ID Hs00354836_m1, ThermoFisher Scientific) and NLRP3 (Catalog #4331182 Assay ID Hs00918082_m1, ThermoFisher Scientific) was obtained after 5 minutes at 65°C for annealing primer to the template RNA, 2 minutes at 50°C of reverse transcription, 10 minutes at 95°C of denaturation and 44 cycles with the following steps (95°C for 15 seconds and 60°C for 1 min). Cq results were normalized by the total amount of RNA in the sample or by β-actin mRNA expression levels and reported to the condition without any compound (control condition). Data are presented as fold changes and were calculated with relative quantification of ΔCT obtained from quantitative RT-PCR. For the detection of SARS-CoV-2 in the supernatant of infected Huh7 cells, the viral RNA was extracted by automated RNA extractor EZ1 (Quiagen) and real-time RT-PCR was performed by targeting the SARS-CoV-2 RdRp gene as follows: each 20 µl sample consisted of 12.5 µl One Step PrimeScript™ III RT-PCR Kit (Takara Bio, Shiga, Japan), 0.5 µM SARS-CoV-2 CRV forward primer (5'-TCACCTAATTTAGCATGGCCTCT-3'), 0.5 µM SARS-CoV-2 CRV reverse primer (5'-CGTAGTGCAACAGGACTAAGC-3'), 0.1 µM SARS-CoV-2 CRV probe (5'- FAM-ACAGCAGAATTGGCCCTTAAAGCT-BHQ1-3'), 4 µl of purified nucleic acid and nuclease-free water. The in-house one-step RT-PCR reaction mixtures were run in a CFX Connect Real-Time PCR instrument (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using previously standardized thermal conditions (52°C for 5 minutes, 95°C for 10 seconds, 45 cycles of 10 seconds at 95°C, and 62°C for 30 seconds).

Detection of IL-1β cytokine release

Supernatants harvested from PMA-stimulated THP1 macrophages, Caco-2 cells or ACE2-A549 cells that were treated with MCC950, depleted for NLRP3 or incubated with COVID-19 patient's serum, and infected as indicated with SARS-CoV-2, or from control uninfected cells were analyzed using ELISA assay for IL-1β, according to the manufacturers' instructions. IL-1β secretion from PMA-THP1 macrophages was detected using IL-1 beta Human ELISA kit (#KHC0011, ThermoFisher Scientific) and IL-1 beta Human ELISA kit, High Sensitivity (#BMS224HS, ThermoFisher Scientific) was used for the detection of IL-1β secretion from epithelial cells.

Cell viability assays

Vero E6 cells and ACE2-A549 cells were pretreated with indicated concentrations of PPADS, OxATP and/or BzATP during 4 hours before infection and infected or not with SARS-CoV-2 BetaCoV/France/IDF0372/2020 strain with a multiplicity of infection between 1 and 2. Cell viability was determined after 72 hours using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (#M5655, Sigma) following manufacturer's instructions. Cell viability was also performed in uninfected Vero E6 cells, Caco-2 cells, ACE2-A549 cells and primary salivary gland epithelial cells with the same compounds incubated for 48 hours.

Immunohistochemistry

Post-mortem lung specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin. Tissue sections were deparaffinized, rehydrated, incubated in 10 mM sodium citrate pH 6.0, microwaved for antigen retrieval and treated with 3% H_2O_2 to block endogenous peroxidase activity. Then, mouse antibodies against NLRP3/NALP3 (#AG-20B-0014, AdipoGen) (1:100), CD68 (#KP-1, Ventana) (prediluted), or double-stranded RNA (#J2-2004, Scicons J2) (1:500) and biotinylated goat anti-mouse IgG (#BA-9200, Vector) were incubated with lung sections. Immuno-reactivities were visualized using avidin-biotin complex-based peroxidase system (#PK-7100, Vector) and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) peroxidase (HRP)

substrate Kit (#SK-4100, Vector). Lung sections were also stained with hematoxylin and eosin, as previously described (54) and assessed by two independent observers without the knowledge of clinical diagnosis, using a Leica DM2500 LED Optical microscope and a 63x objective.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad). Statistical tests and calculated p values ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, and $^{****}p < 0.0001$) are indicated in each figure and corresponding figure legend.

Results

Increased NLRP3 expression level in alveolar macrophages, pneumocytes and syncytia detected in lung autopsies of patients with SARS-CoV-2 pneumonia

To study the potential contribution of NLRP3 to SARS-CoV-2 pathogenesis, we first analyzed the expression of NLRP3 in lung tissue samples obtained from three uninfected individuals and seven SARS-CoV-2-infected patients who died from COVID-19 (Tables 1, 2). Autopsies were stained with hematoxylin and eosin, or incubated with antibody against NLRP3 and analyzed. As previously described (55), parenchymal multifocal damages with intra-alveolar inflammation, fibrin and hyaline membrane formation that are consistent with a diagnosis of diffuse alveolar damage were observed in all SARS-CoV-2-infected patients. The pattern of developed pneumonia (with fibrotic organization and type 2 pneumocyte hyperplasia) and fibroblastic foci formed by the loss of organized connective tissue consistent with alveolar duct fibrosis were also detected (Figure 1A). Besides, the presence of inflammatory cells (composed mainly of macrophages and lymphocytes) was the main characteristic of COVID-19 patient autopsies (Figure 1A). NLRP3 expression was then examined on these samples, and immuno-reactive NLRP3 was mainly detected in Type II pneumocytes (Figures 1B, C) and alveolar macrophages (Figures 1B, D) from both SARS-CoV-2 patients and uninfected specimens, which have been previously shown to be cellular targets of SARS-CoV-2 (56, 57). Interestingly, we also detected in SARS-CoV-2-infected lung tissues, some syncytia that expressed macrophage marker, CD68 (Figure 1E), NLRP3 (Figure 1F) and viral RNA (Figure 1G), revealing a potential link between NLRP3 expression and viral infection.

TABLE 1 Demographics, autopsy cause of death and lung histopathology findings of COVID-19 patients.

Patient number	Sex, M/F	Age, y	Postmortem cause of death	Lung histopathology findings
1	M	35	SARS-CoV-2 infection. Cardiorespiratory failure.	Diffuse alveolar damage - Hyaline membranes - Alveolar plug - Hemorragia - Hypertrophy of type II pneumocyte - Vascular inflammatory cells - Alveolar fibrin deposit - Inflammatory cells in the adventitia.
2	M	54	SARS-CoV-2 infection. Cardiorespiratory failure.	Diffuse alveolar damage - Multinucleated giant cells - Alveolar plug - Vasculitis - Hemorragia - Vascular inflammatory cells - Hypertrophy of type II pneumocyte - Microthrombi - Inflammatory cells in the adventitia.
3	M	81	SARS-CoV-2 infection. Cardiorespiratory failure.	Alveolar plug - Diffuse alveolar damage - Fibrosis - Hyaline membranes - Multinucleated giant cells - Hemorragia - Vascular inflammatory cells - Hypertrophy of type II pneumocyte.
4	F	82	SARS-CoV-2 infection. Cardiorespiratory failure.	Fibrosis - Hyaline membranes - Alveolar plug - Hemorragia - Hypertrophy of type II pneumocyte - Alveolar fibrin deposit - Inflammatory cells in the adventitia.
5	M	58	SARS-CoV-2 infection. Cardiorespiratory failure.	Diffuse alveolar damage - Alveolar plug - Vascular inflammatory cells - Hypertrophy of type II pneumocyte - Alveolar fibrin deposit - Microthrombi - Hemorragia.
6	M	65	SARS-CoV-2 infection. Cardiorespiratory failure.	Diffuse alveolar damage - Vascular inflammatory cells - Hypertrophy of type II pneumocyte - Alveolar fibrin deposit - Microthrombi - Alveolar plug - Inflammatory cells in the adventitia.
7	F	64	SARS-CoV-2 infection. Cardiorespiratory failure.	Diffuse alveolar damage - Alveolar plug - Hemorragia - Vascular inflammatory cells - Hypertrophy of type II pneumocyte - Alveolar fibrin deposit - Microthrombi - Inflammatory cells in the adventitia.

TABLE 2 Demographics, autopsy cause of death and lung histopathology findings of non-COVID-19 patients.

Patient number	Sex, M/F	Age, y	Postmortem cause of death	Lung histopathology findings
1	F	85	Hemorragia. Penetrating gastric ulcer.	Pulmonary capillaritis.
2	M	76	Cardiorespiratory failure.	Pulmonary capillaritis.
3	M	43	Interstitial pneumonia.	Pulmonary fibrosis.

Increased IL-1β secretion is associated with NLRP3 inflammasome activation during abortive macrophage infection with SARS-CoV-2

Given that macrophages are key cellular players for COVID-19 pathogenesis (58) and inflammasome activation was detected in SARS-CoV-2-infected macrophages (30), we first analyzed the expression of NLRP3 during the infection of macrophages with SARS-CoV-2. Interestingly, we found that NLRP3 expression level increased 24 hours after SARS-CoV-2 infection in phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) - differentiated human THP1 macrophages with different multiplicities of infection (MOI) (Figure 2A, Supplementary Figure 1A) or at different time points after infection with a MOI of 0.2 (Figure 2B, Supplementary Figure 1B). Increased NLRP3 expression level was observed in the absence of detectable intracellular SARS-CoV-2 spike (S) protein expression, indicating a lack of viral replication (Figures 2A, B). These results thus confirm, as previously published (30), that NLRP3 expression level is increased in absence of productive infection or during abortive SARS-CoV-2 infection in macrophages. Then, we evaluated the effect of SARS-CoV-2 infection on two hallmarks of inflammasome activation, the oligomerization of the adaptor protein ASC and the production of mature IL-1β (59). The oligomerization of ASC, revealed by the quantification of ASC speck formation (Figures 2C, D), and the release of mature IL-1β (Figures 2E, F) were increased in PMA-THP1 macrophages that were infected with SARS-CoV-2, as compared to uninfected cells (Figures 2C-F). Inactivation of NLRP3 inflammasome with a pharmacological inhibitor MCC950 (Figure 2G, Supplementary Figure 1C) or using specific NLRP3 CRISPR guide RNAs (gRNAs) and the *CAS9* gene (CrNLRP3)

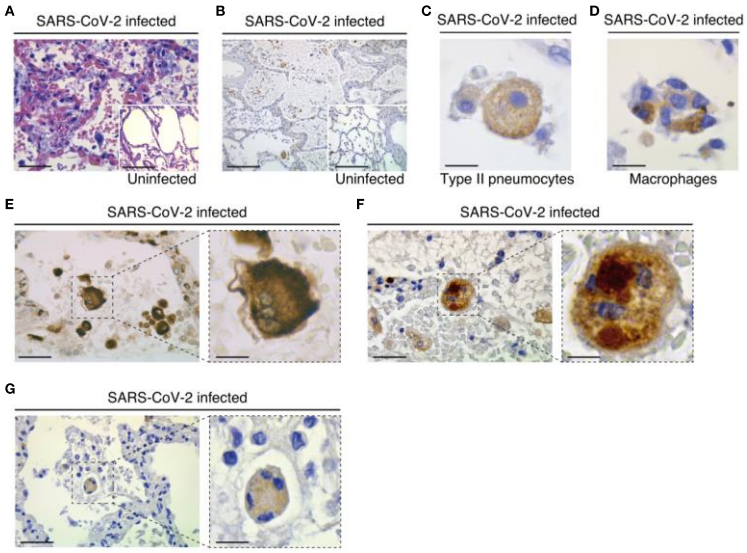


FIGURE 1
Pathological changes and NLRP3 expression in the lungs of COVID-19 patients with severe disease. **(A)** Parenchymal damage (with inflammation and fibrous proliferative phase) and hyperplasic amphophilic type II pneumocytes are detected in COVID-19 patients as compared to non-COVID-19 patients (insert). Hematoxylin and eosin staining is shown (bars, 22 µm and 50 µm). **(B)** NLRP3 expression is detected into alveolar septa and lumen in both COVID-19 and non-COVID-19 patients (bars, 45 µm and 50 µm). **(C)** Type II pneumocytes with cytoplasmic NLRP3 expression (bar, 3 µm). **(D)** NLRP3 positive alveolar macrophage in lumen (bar, 3 µm). **(E-G)** Syncytium detected on COVID-19 patients express macrophage marker CD68 **(E)** (bars, 8 µm and 3 µm), NLRP3 **(F)** (bars, 8 µm and 3 µm) and cytoplasmic double strand RNA, indicative of viral infection **(G)** (bars, 12 µm and 4 µm). Positive stainings (brown) for NLRP3, CD68 or double strand RNA are shown in **(B-G)**. Magnifications are shown in **(E-G)** .

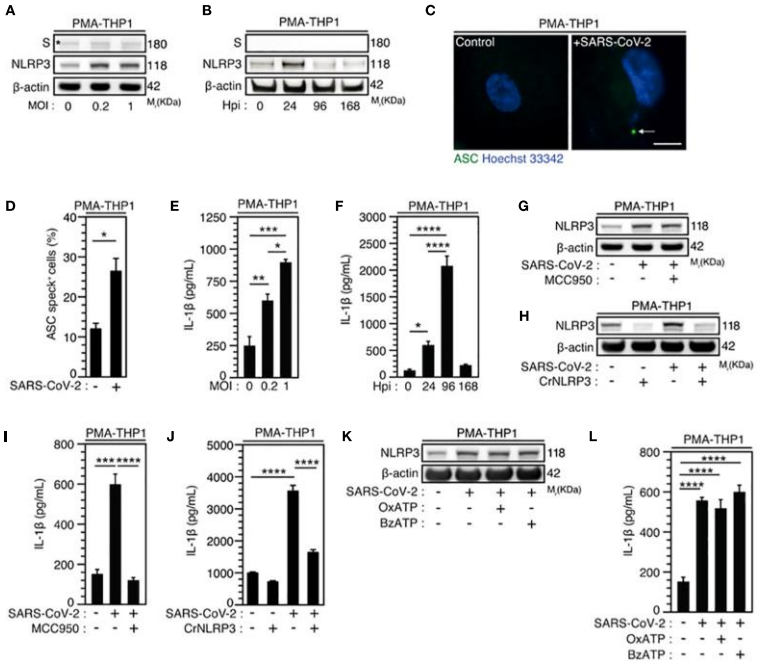


FIGURE 2
SARS-CoV-2 infection induces NLRP3 inflammasome activation independently of P2X7 in macrophages. **(A-F)** PMA-differentiated THP1 cells were infected with SARS-CoV-2 for 24 hours at indicated multiplicity of infection (MOI) **(A)** or during indicated hours post-infection (Hpi) (MOI = 0.2) **(B)** and evaluated for Spike (S), NLRP3 and β-actin expression **(A, B)** or IL-1β secretion **(E, F)**. Representative images **(C)** and percentages **(D)** of control or PMA-differentiated THP1 cells infected for 24 hours (MOI = 0.2), with ASC speck formation (ASC^+) are shown. Arrow indicates ASC^+ speck. DNA is detected using Hoechst 33342 (bar, 10 μm). **(G-J)** PMA-differentiated THP1 cells that were incubated with the NLRP3 inflammasome inhibitor, MCC950 (20 μM) **(G, I)**, and PMA-differentiated, control (CrCo.) or NLRP3-depleted (CrNLRP3) THP1 cells **(H, J)** were infected with SARS-CoV-2 for 24 hours (MOI = 0.2) and evaluated for NLRP3 and β-actin expression **(G, H)** or IL-1β secretion **(I, J)**. **(K, L)** PMA-differentiated THP1 cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.2) for 24 hours, in presence of control vehicle, the P2X7 inhibitor OxATP, or the P2X7 activator BzATP, and evaluated for NLRP3 and β-actin expression **(K)** or IL-1β secretion **(L)**. In **(A)**, the asterisk (*) is indicating a non-specific band. Data are presented as means ± SEM from at least 3 independent experiments. *p* values (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ and ****$p < 0.0001$) were determined using unpaired t-test **(D)** and one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test (**E, F, I, J, L**).

(Figure 2H, Supplementary Figure 1D) significantly reduced the release of mature IL-1β by PMA-THP1 macrophages that were infected with SARS-CoV-2 during 24 hours (Figures 2I, J). These results reveal that NLRP3 inflammasome is activated during abortive SARS-CoV-2 infection in macrophages. Given that the purinergic receptor P2X7 has been extensively involved in the activation of NLRP3 inflammasome (59), we also investigated the impact of P2X7 antagonist oxidized ATP (OxATP) or agonist 2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl) adenosine 5'-triphosphate (BzATP) on NLRP3 inflammasome activation elicited by SARS-CoV-2. Pharmacological inhibition or activation of P2X7 with respectively, OxATP or BzATP (Figures 2K, L), did not modulate increased expression level of NLRP3 (Figure 2K, Supplementary Figure 1E) nor IL-1β release (Figure 2L) from PMA-treated THP1 macrophages that were infected with SARS-CoV-2. Results reveal that the activation of NLRP3 inflammasome detected during the infection of PMA-treated THP1 macrophages with SARS-CoV-2 does not require the purinergic receptor P2X7. Taken together, these results indicate that NLRP3 inflammasome activation is detected during the early steps of human macrophage infection with SARS-CoV-2.

NLRP3 acts as a proviral host factor for SARS-CoV-2 infection

Considering that epithelial cells, which have been identified as primary targets of viral replication in the lung and the nasal epithelium of SARS-CoV-2-infected patients (56, 60, 61), also express NLRP3 inflammasome (62), we then analyzed the activation of NLRP3 inflammasome during the infection of permissive host Caco-2 cells and ACE2-overexpressing A549 (ACE2-A549) cells. Surprisingly, a weak, but significant SARS-CoV-2-MOI-dependent release of IL-1β was detected in response

to Caco-2 (Figure 3A) and ACE2-A549 (Figure 3C) infection during 24 hours. The IL-1β secretion was also detected at a MOI of 4 up to 48 hours after infection with SARS-CoV-2 at the same target cells (Figures 3B, D). IL-1β secretion is reduced when SARS-CoV-2 was preincubated and neutralized with COVID-19 patient's serum before infection of ACE2-A549 cells (Figure 3E), thus revealing that NLRP3 inflammasome is activated after viral entry into permissive host cells. We next evaluated whether the activation of NLRP3 inflammasome in epithelial cells might affect viral replication, as previously shown during SARS-CoV-2 infection of macrophages (30). We determined the impact of two inhibitors that act on NLRP3 by distinct mechanisms (63–65), MCC950 and Tranilast, on viral replication. Despite the fact that MCC950 did not modulate viral replication in ACE2-A549 cells (Figure 3K, Supplementary Figures 2A-C), Tranilast significantly reduced the replication of SARS-CoV-2 in Caco-2 cells (Figures 3F, H, Supplementary Figure 2D) and ACE2-A549 cells (Figures 3G, I-K, Supplementary Figure 2E). These results were revealed by detecting the intracellular expression of spike (S) protein (Figures 3F, G, Supplementary Figures 2A, B, D, E), the detection of viral E RNA expression (Figures 3H, I), the frequency of spike (S)-positive cells (Figures 3J, K, Supplementary Figure 2C) and the cellular viability of treated cells (Supplementary Figures 2F-H). As expected, SARS-CoV-2 that was preincubated with serum of convalescent COVID-19 patients did not infect host cells (Figures 3J, K). We also examined the impact of NLRP3 depletion on viral replication using small interfering RNA (Figures 3L-O). Importantly, the depletion of NLRP3 in Caco-2 and ACE2-A549 cells (Figures 3L, N) decreased the replication of SARS-CoV-2, as revealed by the decrease of viral RdRp RNA (Figures 3M, O). Altogether, these results demonstrate that NLRP3 acts as a proviral host factor that is required for SARS-CoV-2 infection and replication in target epithelial cells.

Caspase-1 activation is also required for SARS-CoV-2 replication

Considering that caspase-1, which is a substrate of NLRP3 inflammasome activation (66, 67) mainly involved in the protection of host cells against microbial infection (68), was also shown to promote host cell survival in response to microbial virulence factors such as *Aeromonas* aerolysin (69), we examined the contribution of caspase-1 to SARS-CoV-2 viral replication. The pharmacological inhibition of caspase-1 using YVAD inhibitor in Caco-2 (Figures 4A, C) and ACE2-A549 (Figures 4B, D) cells reduced SARS-CoV-2 infection, as revealed by the frequency of spike (S)-positive cells at 24 hours after infection (Figures 4A-D), without affecting cellular viability (Supplementary Figures 3A, B). Accordingly, the depletion of caspase-1 using small interfering RNA in Caco-2 (Figure 4E) and ACE2-A549 (Figure 4G) cells also significantly reduced the detection of viral RdRp mRNA (Figure 4F) and intracellular spike (S) protein (Figure 4H, Supplementary Figure 3C), as compared to control cells. Altogether, these results reveal that caspase-1 also contributes to SARS-CoV-2 infection and replication.

Purinergic receptor P2X7 dictates NLRP3 inflammasome activation for SARS-CoV-2 replication

As previously published (41, 43, 70), we initially revealed the contribution of purinergic receptors to the early steps of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. To evaluate the possibility that P2X7, an important partner of NLRP3 inflammasome activation, might also affect SARS-CoV-2 viral replication, we next examined the impact of a non-selective antagonist of purinergic receptors P2X, the pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS) and the P2X7-specific antagonist OxATP, on SARS-CoV-2 viral replication and related cellular damage. The inhibition of P2X and P2X7 activities by PPADS and/or OxATP reduced the frequency of spike (S)-positive cells (Figures 5A-D) and the expression level of viral E RNA (Figure 5E) elicited by SARS-CoV-2 in Vero E6 cells (Figures 5A, C) and ACE2-A549 (Figures 5B, D, E). PPADS and OxATP partially affected viability of uninfected Vero E6 cells (Supplementary Figures 4A, B) at the concentration of 100 μM, but not at working concentration (10 μM). Moreover, OxATP did not show any effect on the viability of ACE2-A549 cells (Supplementary Figure 4C). Accordingly, P2X7 depletion using small interfering RNA significantly reduced intracellular spike (S) expression level detected after 48-hour infection of ACE2-A549 cells with SARS-CoV-2 (Figure 5F, Supplementary Figures 4D, E). Conversely, the activation of P2X7 with BzATP increased replication of SARS-CoV-2, as revealed by the increase of intracellular spike (S) expression levels (Figures 5B, D) and viral E expression level (Figure 5G), but did not show a significant impact on cellular viability (Supplementary Figure 4F). We then analyzed impact of OxATP on the replication of SARS-CoV-2 into primary salivary gland epithelial cells, which have been identified as primary targets for SARS-CoV-2 in SARS-CoV-2-infected patients (71), and confirmed that OxATP significantly reduced SARS-CoV-2 replication, as revealed by the reduction of RdRp mRNA expression level in primary salivary gland epithelial cells that were treated with OxATP and infected during 48 hours with SARS-CoV-2 (Figure 5H). This process occurs without affecting the viability of primary salivary gland epithelial cells (Supplementary Figure 4G). Finally, we analyzed the effect of P2X7 inhibition on the replication of SARS-CoV-2 Alpha variant and determined the amount of viral RdRp RNA released in the supernatant of liver Huh7 cells that were infected with SARS-CoV-2 Alpha variant in presence or in absence of OxATP. We observed that OxATP significantly reduced the release of viral particles in the supernatant of SARS-CoV-2-infected Huh7 cells (Figure 5I), thus revealing that purinergic receptor P2X7 also regulates the replication of SARS-CoV-2 Alpha variant. To determine whether the purinergic receptor P2X7 may act upstream of NLRP3 inflammation activation, ACE2-A549 cells were infected during 48 hours with SARS-CoV-2 in presence of indicated concentrations of BzATP and/or Tranilast. As previously shown (Figures 3F-K, 5B, D, G), the intracellular expression of spike (S) protein elicited by the infection of ACE2-A549 cells with SARS-CoV-2 was increased or decreased in presence of BzATP or Tranilast, respectively (Figure 5J). Interestingly, we observed that

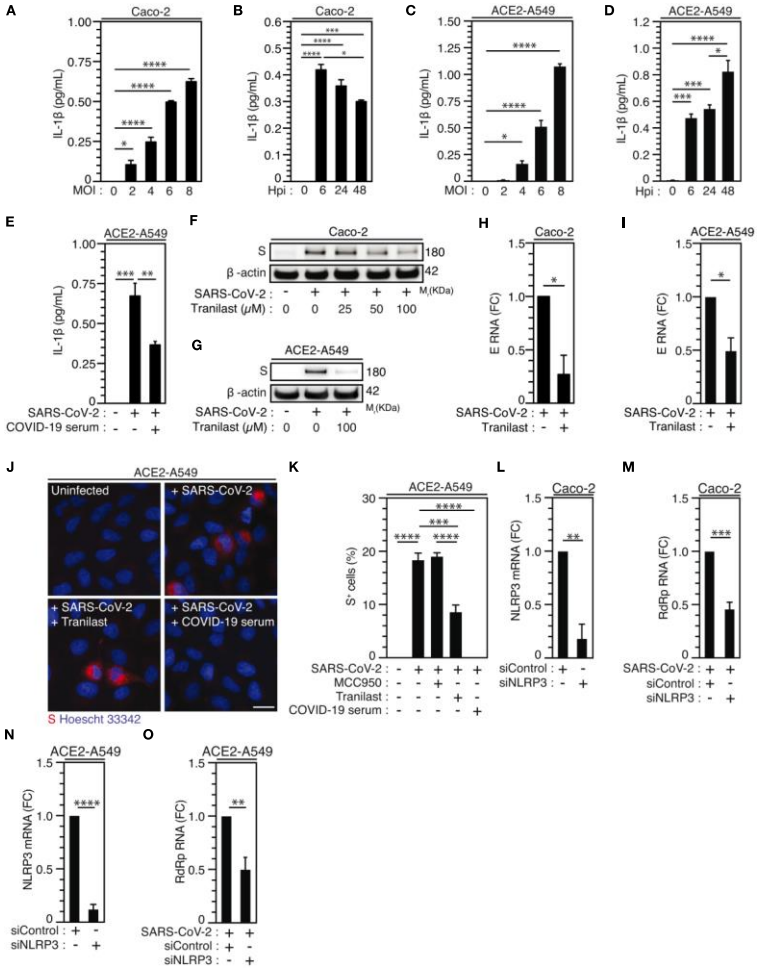


FIGURE 3
NLRP3 inflammasome activation dictates permissiveness of epithelial cells to SARS-CoV-2 infection. **(A–D)** Caco-2 **(A, B)** or ACE2-A549 **(C, D)** cells were infected with SARS-CoV-2 for 48 hours at indicated MOI **(A, C)** or during indicated hours post-infection (hpi) (MOI = 4) **(B, D)** and IL-1β secretion was monitored. **E** ACE2-A549 cells were infected during 48 hours with SARS-CoV-2 or with SARS-CoV-2 neutralized with convalescent COVID-19 patient serum. IL-1β secretion was then monitored. **(F, G)** Caco-2 **(F)** and ACE2-A549 **(G)** cells were infected (or not) with SARS-CoV-2 (MOI = 2) during 48 hours in presence of indicated concentrations of Tranilast and evaluated for Spike (S) and β-actin expressions. **(H, I)** Caco-2 **(H)** or ACE2-A549 **(I)** cells were infected for 48 hours with SARS-CoV-2 (MOI = 0.2) in presence of 100 μM Tranilast, and analyzed for SARS-CoV-2 E RNA expression using quantitative RT-PCR. Fold changes **(FC)** are indicated. **(J, K)** ACE2-A549 cells were infected for 48 hours with SARS-CoV-2 (MOI = 2) in presence of 20 μM MCC950, 100 μM Tranilast or with SARS-CoV-2 neutralized with convalescent COVID-19 patient serum and analyzed for spike (S) expression by fluorescence microscopy. Representative images (bar, 20 μm) **(J)** and percentages of spike (S)-positive (S^+) cells **(K)** are shown. DNA is detected using Hoechst 33342. **(L–O)** Caco-2 **(L, M)** or ACE2-A549 **(N, O)** cells were subjected to siRNA against NLRP3 for 48 hours and analyzed for NLRP3 mRNA expression **(L, N)** or infected with SARS-CoV-2 for 48 hours and evaluated for SARS-CoV-2 RdRp RNA expression, by quantitative RT-PCR **(M, O)**. RT-PCR samples were first normalized by β-actin mRNA level in each sample, and then normalized to the control condition. The data are presented as means ± SEM from at least 3 independent experiments. *p* values (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 and *****p* < 0.0001) were determined using one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test **(A–E, K)** and unpaired t-test **(H, I, L–O)**.

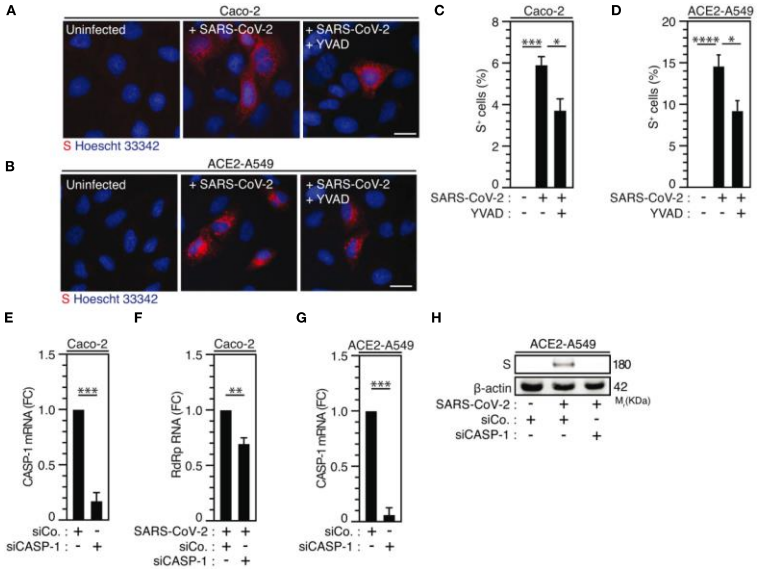


FIGURE 4
Caspase-1 activity regulates SARS-CoV-2 replication. **(A-D)** Caco-2 **(A, C)** or ACE2-A549 **(B, D)** were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 2) in presence of 50 μM of caspase-1 inhibitor, Ac-YVAD-cmk (YVAD), for 48 hours and analyzed for spike (S) expression by fluorescence microscopy. Representative images (bar, 20 μm) **(A, B)** and percentages of spike (S)-positive (S^+) cells **(C, D)** are shown. DNA is detected using Hoechst 33342. **(E-H)** Caco-2 **(E, F)** and ACE2-A549 **(G, H)** were treated with siRNA against caspase-1 (CASP-1) for 48 hours and analyzed for CASP-1 mRNA quantification by RT-PCR **(E, G)**, or infected with SARS-CoV-2 at MOI = 0.2 **(F)** or MOI = 2 **(H)** during 48 hours, and analyzed for SARS-CoV-2 RdRp RNA expression by quantitative RT-PCR **(F)** or for spike (S) and β-actin expressions **(H)**. The data are presented as means ± SEM from at least 3 independent experiments. *p* values (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 and *****p* < 0.0001) were determined using one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test **(C, D)** and unpaired t-test **(E-G)**.

the treatment of ACE2-A549 cells with both BzATP and Tranilast significantly reduced the intracellular spike (S) expression level detected after 48 hours of infection, as compared to ACE2-A549 cells that were infected in presence of BzATP (Figure 5J), thus demonstrating that the purinergic receptor P2X7 acts upstream to NLRP3 inflammasome activation and dictates viral replication.

Purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome regulate SARS-CoV-2 replication at a post-entry level

Then, we determined whether purinergic receptor P2X7 and NLRP3 might control SARS-CoV-2 replication through the modulation of viral entry. We analyzed viral entry by using SARS-CoV-2 spike (S) pseudotyped HIV-1. Thus, we incubated ACE2 and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing A549 (ACE2-TMPRSS2-A549) highly permissive cells with OxATP, BzATP or serum of convalescent COVID-19 patients during 4 hours before their infection with green fluorescent protein (GFP)-tagged HIV-1NL4-$3_{\Delta Env}$ variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-GFP-LV) (Figures 6A-E). Then, we analyzed the viral entry by detecting after 48-hour infection, the frequency of GFP^+ cells and observed that OxATP and BzATP did not reduce the frequency of GFP^+ cells detected in S-GFP-LV-infected ACE2-TMPRSS2-A549 cells (Figures 6A-D, F). Of note, serum of convalescent COVID-19 patients efficiently reduced the frequency of GFP^+ cells detected after 48 hours of infection (Figures 6E, F). These results were confirmed by detecting the intracellular HIV-1 Cap24 capsid in ACE2-TMPRSS2-A549 cells (Figure 6G, Supplementary Figure 5A), ACE2-A549 cells (Supplementary Figure 5B) and Vero E6 cells (Figure 6H, Supplementary Figure 5C) that were infected by S-GFP-LV during 4 hours in presence (or not) of OxATP, BzATP or serum of convalescent COVID-19 patients (Figures 6G, H, Supplementary Figures 5A-C) and revealed that purinergic receptor P2X7 does not regulate SARS-CoV-2 entry into host cells. Similarly, we analyzed the frequency of GFP^+ cells detected after 48-hour infection of ACE2-TMPRSS2-A549 cells with S-GFP-LV in presence (or not) of Tranilast, YVAD or serum of convalescent patients. We observed that Tranilast and YVAD did not reduce the frequency of GFP^+ cells, as compared to cells treated with serum of convalescent patients (Figures 6I-N). These results were confirmed by detecting the intracellular HIV-1 Cap24 capsid in ACE2-TMPRSS2-A549 cells (Figure 6O, Supplementary Figure 5D) and ACE2-A549 cells (Figure 6P, Supplementary Figure 5E) that were infected with S-GFP-LV during 4 hours in presence (or not) of Tranilast. Since ACE2

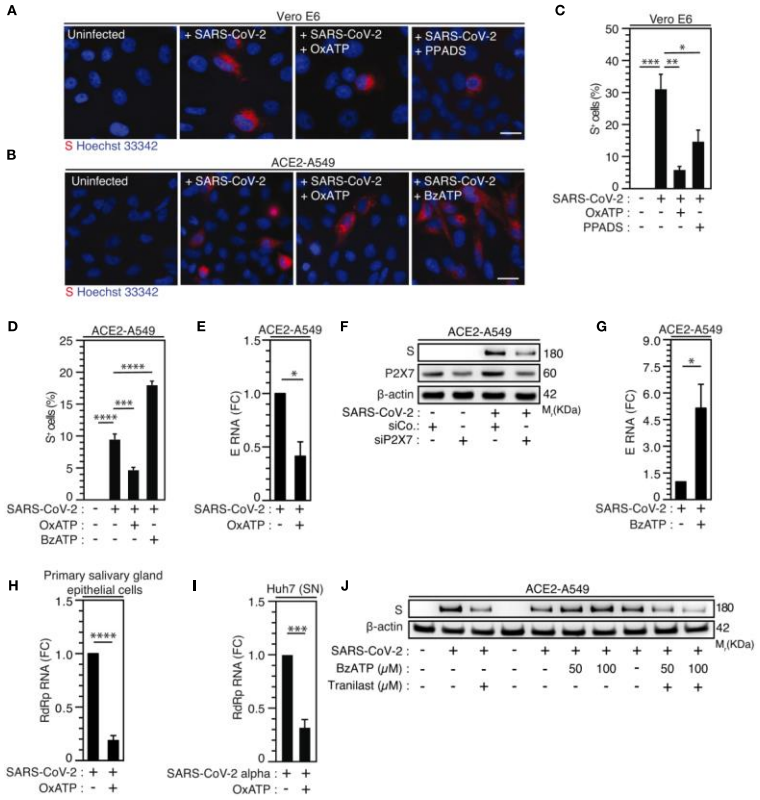


FIGURE 5
Purinergic receptor P2X7 modulates SARS-CoV-2 replication through NLRP3 inflammasome activation. **(A–D)** Vero E6 **(A, C)** or ACE2-A549 **(B, D)** cells were infected with SARS-CoV-2 at MOI = 0.1 for 24 hours **(A, C)** or at MOI = 2 for 48 hours **(B, D)**, with 10 μM OxATP and 50 μM PPADS **(A, C)** or with 100 μM OxATP and 100 μM BzATP **(B, D)** and analyzed for spike (S) expression by fluorescence microscopy. Representative images (bar, 20 μm) **(A, B)** and percentages of spike (S)-positive (S^+) cells **(C, D)** are shown. DNA is detected using Hoechst 33342. **(E)** ACE2-A549 cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.2) for 48 hours in presence of 100 μM OxATP and analyzed for SARS-CoV-2 E RNA expression by quantitative RT-PCR. **(F)** ACE2-A549 cells were treated with siRNA against P2X7 for 48 hours and analyzed for spike (S), P2X7 and β-actin expression. **(G)** ACE2-A549 cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.2) for 48 hours in presence of 100 μM BzATP and analyzed for SARS-CoV-2 E RNA expression by quantitative RT-PCR. **(H)** Primary salivary gland epithelial cells were infected with SARS-CoV-2 (MOI = 0.5) for 48 hours in presence of 100 μM OxATP and analyzed for SARS-CoV-2 RdRp RNA expression by quantitative RT-PCR. **(I)** Huh7 cells were infected with SARS-CoV-2 Alpha variant in presence of 100 μM OxATP for 48 hours. Then, the viral yielding was determined by detecting RdRp RNA expression by quantitative RT-PCR in the supernatant (SN) of control and SARS-CoV-2 Alpha variant infected Huh7 cells. Fold changes (FC) are indicated in **(E, G–I)**. **(J)** ACE2-A549 cells were infected with SARS-CoV-2 during 48 hours (MOI = 2) in presence of control, 50 or 100 μM BzATP, 100 μM Tranilast, or the combination of either 50 μM BzATP and 100 μM Tranilast or 100 μM BzATP and 100 μM Tranilast, and analyzed for spike (S) and β-actin expression. All experiments are representative of at least 3 independent experiments. The data are presented as means ± SEM from at least 3 independent experiments. *p* values (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ and ****$p < 0.0001$) were determined using one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test **(C, D)** and unpaired t-test **(E, G–I)**.

expression was shown to control viral entry (72), Vero E6 cells (Supplementary Figures 6A, B) and ACE2-A549 cells (Supplementary Figures 6C-F) were treated with OxATP, BzATP, Tranilast and/or YVAD, for 6 hours (Supplementary Figures 6A, B), 4 hours (Supplementary Figures 6C, D), or 24 hours (Supplementary Figures 6E, F), and ACE2 membrane expression was analyzed by flow cytometry. The expression of ACE2 did not change in the presence of the agonist of P2X7 (BzATP), the selective antagonist of P2X7 (OxATP), the selective inhibitor of NLRP3 (Tranilast) and the selective inhibitor of caspase-1 (YVAD), implying that the purinergic receptor P2X7, the protein NLRP3 and the caspase-1 do not affect the membrane expression of ACE2. Altogether, these results demonstrate that the activation of the purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome supports SARS-CoV-2 replication into target cells without modulating viral entry.

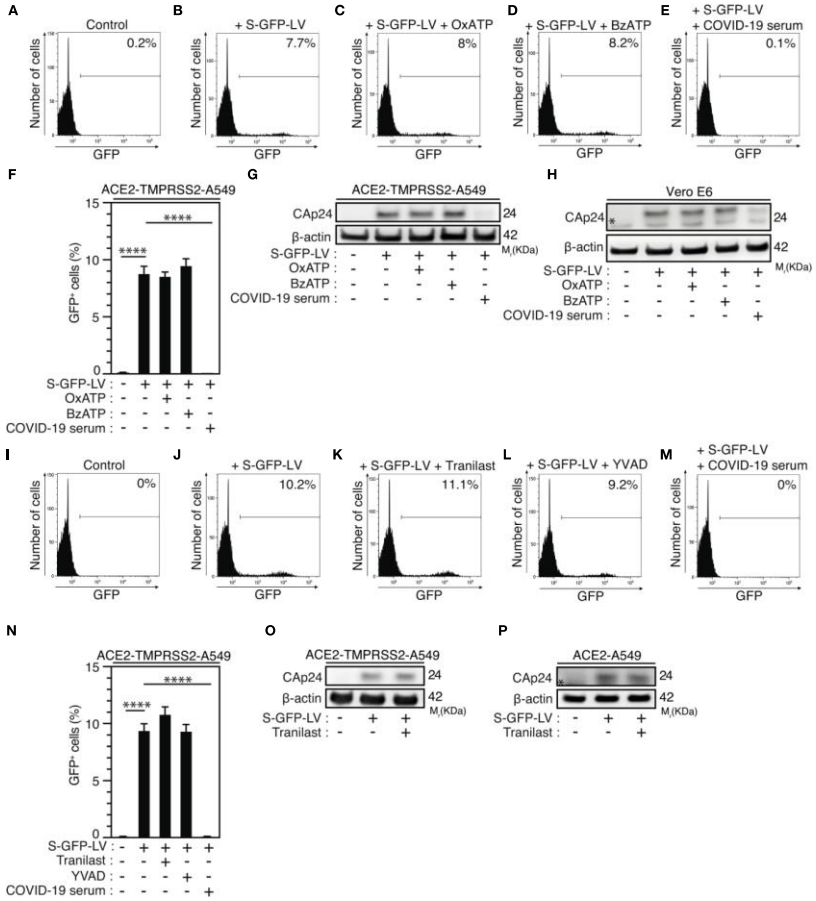


FIGURE 6
Purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome control SARS-CoV-2 replication without affecting viral entry. **(A–H)** ACE2-TMPRSS2-A549 **(A–G)** or Vero E6 **(H)** cells were incubated during 4 hours with control **(A, B)**, 100 μM OxATP **(C)**, 100 μM BzATP **(D)**, and infected for 48 hours **(B–F)** or 4 hours **(G, H)** with green fluorescent protein (GFP)-tagged HIV-1NL4-3$_{\Delta Env}$ variant (defective in viral envelope) pseudotyped with the SARS-CoV-2 spike (S) envelope (S-GFP-LV) or convalescent COVID-19 serum neutralized S-GFP-LV **(E–H)**, and analyzed for GFP fluorescence by flow cytometry **(A–F)** or for intracellular HIV-1 CAp24 capsid and β-actin expression **(G, H)**. Representative flow cytometry analysis **(A–E)** and percentages of GFP$^+$ cells **(F)** are shown. **I–P** ACE2-TMPRSS2-A549 **(I–O)** or ACE2-A549 **(P)** cells were incubated during 4 hours with control **(I, J)**, 100 μM Tranilast **(K)** or 100 μM YVAD **(L)** and infected for 48 hours **(J–L)** or 4 hours **(O, P)** with S-GFP-LV **(J–L, N–P)** or with convalescent COVID-19 serum neutralized S-GFP-LV **(M, N)**. Then, cells were analyzed for GFP fluorescence by flow cytometry **(I–N)** or for intracellular HIV-1 CAp24 capsid and β-actin expression **(O, P)**. Representative flow cytometry analysis **(I–M)** and percentages of GFP$^+$ cells **(N)** are shown. In **(P)**, the asterisk (*) is indicating a non-specific band. The data are presented as means ± SEM from at least 3 independent experiments. *p* values (****$p < 0.0001$) were determined using one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test **(F, N)**.

Discussion

With the goal of studying the potential contribution of the purinergic receptor P2X7 and the NLRP3 inflammasome to the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection, our study revealed that these two major sensors of danger signals participate to the early steps of SARS-CoV-2 infection. The activation of inflammasomes was detected during COVID-19 and positively correlates with disease severity in humans (29). Despite the fact that several inflammasomes were proposed to be activated and to contribute to organ dysfunction and disease severity during COVID-19 (29), the activation of NLRP3 inflammasome was recently associated

with chronic stages of COVID-19 in humans (29) and in preclinical mouse models (30, 73). Several host targets (such as neutrophils, monocytes/macrophages and lymphocytes), which have been associated with the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection (74), exhibited NLRP3 inflammasome activation during severe COVID-19. NLRP3-dependent inflammasome activation and uncontrolled extracellular traps (NET) production by neutrophils have been proposed to contribute to hyper-inflammation and dysregulated coagulation in COVID-19 patients with severe disease (75–77). Activation of the NLRP3 inflammasome and pyroptosis have been detected in monocytes and macrophages during SARS-CoV-2 infection (30, 34) and COVID-19 (29, 30, 78, 79). In addition, danger signals such as calprotectin recently associated with COVID-19 disease severity (80), are known to activate the NLRP3 inflammasome (81) or to be released as a consequence of its activation (82) and may contribute to pyroptosis (82). Accordingly, we detected the increased expression level of NLRP3 in alveolar macrophages and syncytium from autopsies of COVID-19 patients with severe disease, and observed the activation of NLRP3 inflammasome during the infection of PMA-treated THP1 macrophages with SARS-CoV-2 *in vitro*. Interestingly, our study also revealed that NLRP3 inflammasome activation can also be detected in permissive host epithelial cells during early steps of SARS-CoV-2 infection and is required for SARS-CoV-2 replication. This process is rapidly induced after the interaction of SARS-CoV-2 with target cells, requires the activation of caspase-1 and acts positively at post-entry level on viral replication steps. Precise effects of NLRP3 inflammasome activation on cellular events (such as viral translation, polyprotein processing, double membrane vesicle (DMV) formation, replication organelle formation and activity) regulating SARS-CoV-2 replication (83) remain to be defined. In addition to its well-established role in triggering inflammation during microbial infection (68), our results highlighted an unexpected contribution of NLRP3 inflammasome activation to SARS-CoV-2 pathogenesis through the promotion of viral replication. Our results are in agreement with recent report revealing that pharmacological inhibition of NLRP3 inflammasome with MCC950 or knockout of NLRP3 abrogate both SARS-CoV-2 replication and associated inflammation during infection of human ACE2 mice (84). Considering the ability of caspase-1 to regulate the activation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs), whose expressions have been detected increased in patients with severe COVID-19 (85) and genetic manipulations revealed their contributions to SARS-CoV-2 life cycle (83, 86, 87), further investigations to define the potential interplay between NLRP3 inflammasome activation, fatty acid and cholesterol metabolism and SARS-CoV-2 replication would be of interest and should help to identify key mechanisms regulating the replication of SARS-CoV-2 that could be druggable targeted for COVID-19 treatment.

Our study demonstrated that the purinergic receptor P2X7 is also a key host factor in the SARS-CoV-2 replication cycle. The activation of purinergic receptor P2X7 supports SARS-CoV-2 replication without interfering with ACE2 membrane expression and viral entry. By deciphering the relationship between purinergic receptor P2X7 and NLRP3 inflammasome activation during the early steps of SARS-CoV-2 infection, our study demonstrated that purinergic receptor P2X7 acts upstream the activation of NLRP3 inflammasome. Since we previously observed that the purinergic receptors control HIV-1 envelope-elicited fusion (41, 43), it is conceivable that upon the interaction of spike (S) protein with host cell receptors and/or in response to the fusogenic activity of spike (S) protein, ATP is released from SARS-CoV-2 target cells and acts in an autocrine fashion on purinergic receptor P2X7 present at the membrane of SARS-CoV-2 target cells to stimulate NLRP3 inflammasome activation and to regulate viral replication.

The therapeutic inhibition of the key host factors of the signaling pathway that we identified in this study (P2X7➔NLRP3➔Caspase-1) could block the SARS-CoV-2 life cycle at the level of viral replication. Ivermectin, which is known to potentiate the activity of the purinergic receptor P2X4 (88), which can form heterotrimeric receptors with P2X7 (89), was recently found to inhibit the replication of SARS-CoV-2 *in vitro* (90), but did not show benefits for COVID-19 patients (91). Nevertheless, further molecular investigations are required to fully understand the role of purinergic receptor family members and associated signaling pathways during the early steps of SARS-CoV-2 infection and COVID-19-associated hyper-inflammation.

The clinical randomized clinical trials (RCT) having evaluating IL-1 inhibitors in severe COVID-19 yielded to controversial results. One RCT (NCT04362813) with canakinumab (a monoclonal antibody against anti-IL-1β) was negative (92). With anakinra, an IL-1 receptor antagonist, one study (NCT04680949) in patients with increased soluble urokinase plasminogen receptor (suPAR) plasma level was positive (93), whereas 2 other trials (NCT04341584, NCT04364009) were negative (94). Our work suggests that targeting inflammasome-dependent IL-1β/IL-18 and/or purinergic signaling pathways may offer a novel opportunity for the treatment of viral infection and hyper-inflammation associated with COVID-19. Our study provides the first rationale for testing specific P2X7 antagonists such as CE-224,535 or JNJ-54175446, which were assessed without success for the treatment of rheumatoid arthritis (NCT00628095) and are under evaluation for the treatment of major depressive disorders (NCT04116606), respectively, alone or in combination with specific antagonists of NLRP3 such as Tranilast or Dapansutrile, which were assessed for the treatment of Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome (CAPS) (NCT03923140) or systolic heart failures (NCT03534297), respectively. Repurposing of these existing drugs for blocking both viral replication and COVID-19-associated hyper-inflammation should rapidly improve the health of COVID-19 patients.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

Whole body complete post-mortem examinations were performed at the National Institute for Infectious Diseases Lazzaro Spallanzani-IRCCS Hospital (Rome, Italy). According to National hospital law, an autopsy in a public hospital is mandatory without requirement of an informed consent by the relatives when the cause of death is unclear, and/or scientific or public interest is present. In this study, autopsies were performed in accordance with the law owing to the unknown cause of death, and to both scientific and public interest in a pandemic novel disease; and no informed consent from the families was required. All performed procedures and investigations were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee (approval number: n° 9/2020), as previously published (54, 95).

Author contributions

DL: Writing – original draft, Validation, Visualization, Formal Analysis, Investigation. RN: Formal Analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft. DT: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft, Visualization. EG-M: Formal Analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft. ADN: Formal Analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft. FS: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. CD: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. PQ: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. VP: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. CR: Investigation, Writing – original draft. AM-K: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. FD: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. LF: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. RM: Investigation, Writing – original draft. PM: Investigation, Writing – original draft. JD: Writing – original draft, Investigation. JP: Investigation, Writing – original draft. ED: Writing – original draft, Formal Analysis, Validation. MN: Writing – original draft, Investigation. NC: Writing – original draft, Formal Analysis, Validation. AP: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft. VS: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft. DG: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft. XM: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft, Methodology, Resources. MC: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft. MPis: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft. AA: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft, Investigation. OD: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – original draft. MPia: Formal Analysis, Validation, Writing – original draft, Funding acquisition. RL: Formal Analysis, Funding acquisition, Validation, Writing – original draft. J-LP: Funding acquisition, Validation, Writing – original draft, Conceptualization, Methodology, Supervision, Visualization.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by funds from Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-IBHU-0001, ANR-10-LABX33, ANR-11-IDEX-003-01 and ANR Flash COVID-19 "MacCOV"), Fondation de France (alliance "tous unis contre le virus"), Electricité de France, Fondation Gustave Roussy, Institut National du Cancer (INCa 9414 and INCa 16087), The SIRIC Stratified Oncology Cell DNA Repair and Tumor Immune Elimination (SOCRATE), Fédération Hopitalo-Universitaire (FHU) CARE (Cancer and Autoimmunity Relationships) (directed by XM, Hôpital Bicêtre, AP-HP) and Université Paris-Saclay (to J-LP), MIUR (PRIN 2012 and FIRB), the ministry of Health of Italy "Ricerca Corrente" and "Ricerca Finalizzata" (COVID-2020-12371817 and COVID-2020-12371675) (to MPia), REACTing and the Fondation pour la Recherche Médicale (AM-CoV-Path program) (to RL). We thank the Domaine d'Intérêt Majeur (DIM, Paris, France) "One Health" and "Immunothérapies, auto-immunité et Cancer" (ITAC) for its support. The Infectious Disease Models and Innovative Therapies research infrastructure (IDMIT) is supported by the "Programmes Investissements d'Avenir" (PIA), managed by the ANR under references ANR-11-INBS-0008 and ANR-10-EQPX-02-01. DL and DT are recipients of PhD fellowships from LabEx LERMIT and Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Cifre#2019/0639), respectively. ADN and EG-M are recipients of PhD fellowships from French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. AM-K is recipient of PhD fellowship from Ecole et Loisir.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge NH TherAguix and ENS Paris-Saclay for supporting our effort against COVID-19 pandemic, Dr. F. Griscelli and Dr. E. Gallois from Biology and Pathology department at Gustave Roussy hospital, Y. Lecluse and S. Salome-Desnoulez from Gustave Roussy's imaging and cytometry platform (PFIC) for their technical support. We thank the staff of the animal facility of IDMIT, particularly B. Delache, M. Pottier, S. Langlois, JM. Robert and F. Relouzat.

Conflict of interest

DT and AA were employed by NH TherAguix SAS. Authors DL, DT, AA, FS, OD and J-LP are listed as co-inventors on a patent application related to SARS-CoV-2 therapy. AP and J-LP are founding members of Findimmune SAS, an Immuno-Oncology Biotech company. J-LP disclosed research funding not related to this work from NH TherAguix and Wonna Therapeutics. NC disclosed research funding not related to this work from GlaxoSmithKline, Roche, Cytune pharma and Sanofi.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The author(s) declared that they were an editorial board member of Frontiers, at the time of submission. This had no impact on the peer review process and the final decision.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1270081/full#supplementary-material

References

1. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med* (2021) 384(5):403–16. doi: 10.1056/NEJMoa2035389

2. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA covid-19 vaccine. *N Engl J Med* (2020) 383 (27):2603–15. doi: 10.1056/NEJMoa2034577

3. Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cardenas V, Shukarev G, Grinsztejn B, et al. Safety and efficacy of single-dose ad26.COV2.S vaccine against covid-19. *N Engl J Med* (2021) 384(23):2187–201. doi: 10.1056/NEJMoa2101544

4. Chen P, Nirula A, Heller B, Gottlieb RL, Boscia J, Morris J, et al. SARS-coV-2 neutralizing antibody LY-coV555 in outpatients with covid-19. *N Engl J Med* (2021) 384(3):229–37. doi: 10.1056/NEJMoa2029849

5. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, Crespo Casal M, Moya J, Falci DR, et al. Early treatment for covid-19 with SARS-coV-2 neutralizing antibody sotrovimab. *N Engl J Med* (2021) 385(21):1941–50. doi: 10.1056/NEJMoa2107934

6. Weinreich DM, Sivapalasingam S, Norton T, Ali S, Gao H, Bhore R, et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with covid-19. *N Engl J Med* (2021) 384(3):238–51. doi: 10.1056/NEJMoa2035002

7. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, Mehta AK, Zingman BS, Kalil AC, et al. Remdesivir for the treatment of covid-19 - final report. *N Engl J Med* (2020) 383 (19):1813–26. doi: 10.1056/NEJMoa2007764

8. Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, Yao W, Kovarova M, Dinnon KH 3rd, et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801. *Nature* (2021) 591(7850):451–7. doi: 10.1038/s41586-021-03312-w

9. Jayk Bernal A, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Delos Reyes V, et al. Molnupiravir for oral treatment of covid-19 in nonhospitalized patients. *N Engl J Med* (2022) 386(6):509–20. doi: 10.1056/NEJMoa2116044

10. Hammond J, Leister-Tebbe H, Gardner A, Abreu P, Bao W, Wisemandle W, et al. Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with covid-19. *N Engl J Med* (2022) 386(15):1397–408. doi: 10.1056/NEJMoa2118542

11. Hermine O, Mariette X, Tharaux PL, Resche-Rigon M, Porcher R, Ravaud P, et al. Effect of tocilizumab vs usual care in adults hospitalized with COVID-19 and moderate or severe pneumonia: A randomized clinical trial. *JAMA Intern Med* (2021) 181(1):32–40. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.6820

12. Kalil AC, Patterson TF, Mehta AK, Tomashek KM, Wolfe CR, Ghazaryan V, et al. Baricitinib plus remdesivir for hospitalized adults with covid-19. *N Engl J Med* (2021) 384(9):795–807. doi: 10.1056/NEJMoa2031994

13. Heyer A, Günther T, Robitaille A, Lütgehetmann M, Addo MM, Jarczack D, et al. Remdesivir-induced emergence of SARS-CoV2 variants in patients with prolonged infection. *Cell Rep Med* (2022) 3(9):100735. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100735

14. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2022) 23(1):3–20. doi: 10.1038/s41580-021-00418-x

15. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-coV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* (2020) 181(2):271–80 e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052

16. Zang R, Gomez Castro MF, McCune BT, Zeng Q, Rothlauf PW, Sonnek NM, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Sci Immunol* (2020) 5(47):eabc3582. doi: 10.1126/sciimmunol.abc3582

17. Matsuyama S, Nao N, Shirato K, Kawase M, Saito S, Takayama I, et al. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2020) 117(13):7001–3. doi: 10.1073/pnas.2002589117

18. Hillen HS, Kokic G, Farnung L, Dienemann C, Tegunov D, Cramer P. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. *Nature* (2020) 584(7819):154–6. doi: 10.1038/s41586-020-2368-8

19. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* (2016) 14(8):523–34. doi: 10.1038/nrmicro.2016.81

20. Bouhaddou M, Memon D, Meyer B, White KM, Rezelj VV, Correa Marrero M, et al. The global phosphorylation landscape of SARS-coV-2 infection. *Cell* (2020) 182 (3):685–712 e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.034

21. Daniloski Z, Jordan TX, Wessels HH, Hoagland DA, Kasela S, Legut M, et al. Identification of required host factors for SARS-coV-2 infection in human cells. *Cell* (2021) 184(1):92–105 e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.030

22. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol* (2020) 20(5):269–70. doi: 10.1038/s41577-020-0308-3

23. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature* (2020) 584 (7821):463–9. doi: 10.1038/s41586-020-2588-y

24. Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY).* (2020) 12(12):11245–58. doi: 10.18632/aging.103372

25. Merad M, Blish CA, Sallusto F, Iwasaki A. The immunology and immunopathology of COVID-19. *Science* (2022) 375(6585):1122–7. doi: 10.1126/science.abm8108

26. Cassel SL, Sutterwala FS. Sterile inflammatory responses mediated by the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol* (2010) 40(3):607–11. doi: 10.1002/eji.200940207

27. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* (2019) 19(8):477–89. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0

28. Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol* (2017) 17(3):151–64. doi: 10.1038/nri.2016.147

29. Rodrigues TS, de Sa KSG, Ishimoto AY, Becerra A, Oliveira S, Almeida L, et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. *J Exp Med* (2021) 218(3):e20201707. doi: 10.1084/jem.20201707

30. Sefik E, Qu R, Junqueira C, Kaffe E, Mirza H, Zhao J, et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature* (2022) 606 (7914):585–93. doi: 10.1038/s41586-022-04802-1

31. Freeman TL, Swartz TH. Targeting the NLRP3 inflammasome in severe COVID-19. *Front Immunol* (2020) 11:1518. doi: 10.3389/fimmu.2020.01518

32. van den Berg DF, Te Velde AA. Severe COVID-19: NLRP3 inflammasome dysregulated. *Front Immunol* (2020) 11:1580. doi: 10.3389/fimmu.2020.01580

33. Zhao N, Di B, Xu LL. The NLRP3 inflammasome and COVID-19: Activation, pathogenesis and therapeutic strategies. *Cytokine Growth Factor Rev* (2021) 61:2–15. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.06.002

34. Ratajczak MZ, Bujko K, Ciechanowicz A, Sielatycka K, Cymer M, Marlicz W, et al. SARS-coV-2 entry receptor ACE2 is expressed on very small CD45(-) precursors of hematopoietic and endothelial cells and in response to virus spike protein activates the nlrp3 inflammasome. *Stem Cell Rev Rep* (2020) 17(1):266–77. doi: 10.1007/s12015-020-10010-z

35. Shi CS, Nabar NR, Huang NN, Kehrl JH. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell Death Discovery* (2019) 5:101. doi: 10.1038/s41420-019-0181-7

36. Chen IY, Moriyama M, Chang MF, Ichinohe T. Severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporin 3a activates the NLRP3 inflammasome. *Front Microbiol* (2019) 10:50. doi: 10.3389/fmicb.2019.00050

37. Pan P, Shen M, Yu Z, Ge W, Chen K, Tian M, et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nat Commun* (2021) 12(1):4664. doi: 10.1038/s41467-021-25015-6

38. Cekic C, Linden J. Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* (2016) 16(3):177–92. doi: 10.1038/nri.2016.4

39. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* (2004) 240:31–304. doi: 10.1016/S0074-7696(04)40002-3

40. He Y, Franchi L, Nunez G. TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1beta production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *J Immunol* (2013) 190(1):334–9. doi: 10.4049/jimmunol.1202737

41. Paoletti A, Allouch A, Caillet M, Saidi H, Subra F, Nardacci R, et al. HIV-1 envelope overcomes NLRP3-mediated inhibition of F-actin polymerization for viral entry. *Cell Rep* (2019) 28(13):3381–94 e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.095

42. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity* (2017) 47(1):15–31. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.020

43. Seror C, Melki MT, Subra F, Raza SQ, Bras M, Saidi H, et al. Extracellular ATP acts on P2Y2 purinergic receptors to facilitate HIV-1 infection. *J Exp Med* (2011) 208 (9):1823–34. doi: 10.1084/jem.20101805

44. Paoletti A, Raza SQ, Voisin L, Law F, Caillet M, Martins I, et al. Editorial: Pannexin-1–the hidden gatekeeper for HIV-1. *J Leukoc Biol* (2013) 94(3):390–2. doi: 10.1189/jlb.0313148

45. Allouch A, Di Primio C, Paoletti A, Le-Bury G, Subra F, Quercioli V, et al. SUGT1 controls susceptibility to HIV-1 infection by stabilizing microtubule plus-ends. *Cell Death Differ* (2020) 27(12):3243–57. doi: 10.1038/s41418-020-0573-5

46. Ferrari D, Idzko M, Muller T, Manservigi R, Marconi P. Purinergic signaling: A new pharmacological target against viruses? *Trends Pharmacol Sci* (2018) 39(11):926–36. doi: 10.1016/j.tips.2018.09.004

47. Wu Q, Allouch A, Paoletti A, Leteur C, Mirjolet C, Martins I, et al. NOX2-dependent ATM kinase activation dictates pro-inflammatory macrophage phenotype and improves effectiveness to radiation therapy. *Cell Death Differ* (2017) 24(9):1632–44. doi: 10.1038/cdd.2017.91

48. Dimitriou ID, Kapsogeorgou EK, Abu-Helu RF, Moutsopoulos HM, Manoussakis MN. Establishment of a convenient system for the long-term culture and study of non-neoplastic human salivary gland epithelial cells. *Eur J Oral Sci* (2002) 110(1):21–30. doi: 10.1034/j.1600-0722.2002.00152.x

49. Hanley B, Lucas SB, Youd E, Swift B, Osborn M. Autopsy in suspected COVID-19 cases. *J Clin Pathol* (2020) 73(5):239–42. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206522

50. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* (2020) 583(7816):459–68. doi: 10.1038/s41586-020-2286-9

51. Levy DN, Aldrovandi GM, Kutsch O, Shaw GM. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2004) 101 (12):4204–9. doi: 10.1073/pnas.0306764101

52. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* (2014) 11(8):783–4. doi: 10.1038/nmeth.3047

53. Allouch A, Voisin L, Zhang Y, Raza SQ, Lecluse Y, Calvo J, et al. CDKN1A is a target for phagocytosis-mediated cellular immunotherapy in acute leukemia. *Nat Commun* (2022) 13(1):6739. doi: 10.1038/s41467-022-34548-3

54. Falasca L, Nardacci R, Colombo D, Lalle E, Di Caro A, Nicastri E, et al. Post-Mortem Findings in Italian Patients with COVID-19 - a Descriptive Full Autopsy Study of cases with and without co-morbidities. *J Infect Dis* (2020) 222(11):1807–15. doi: 10.1093/infdis/jiaa578

55. Carsana L, Sonzogni A, Nasr A, Rossi RS, Pellegrinelli A, Zerbi P, et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. *Lancet Infect Dis* (2020) 20(10):1135–40. doi: 10.1101/2020.04.19.20054262

56. Ziegler CGK, Allon SJ, Nyquist SK, Mbano IM, Miao VN, Tzouanas CN, et al. SARS-coV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell* (2020) 181 (5):1016–35 e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.035

57. Chu H, Chan JF, Wang Y, Yuen TT, Chai Y, Hou Y, et al. Comparative replication and immune activation profiles of SARS-coV-2 and SARS-coV in human lungs: an ex vivo study with implications for the pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis* (2020) 71(6):1400–9. doi: 10.1093/cid/ciaa410

58. Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol* (2020) 20(6):355–62. doi: 10.1038/s41577-020-0331-4

59. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* (2007) 28(9):465–72. doi: 10.1016/j.tips.2007.07.002

60. Ahn JH, Kim J, Hong SP, Choi SY, Yang MJ, Ju YS, et al. Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19. *J Clin Invest* (2021) 131(13):e148517. doi: 10.1172/JCI148517

61. Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, Martinez DR, Asakura T, Dinnon KH 3rd, et al. SARS-coV-2 reverse genetics reveals a variable infection gradient in the respiratory tract. *Cell* (2020) 182(2):429–46 e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.042

62. Santana PT, Martel J, Lai HC, Perfettini JL, Kanellopoulos JM, Young JD, et al. Is the inflammasome relevant for epithelial cell function? *Microbes Infect* (2016) 18(2):93–101. doi: 10.1016/j.micinf.2015.10.007

63. Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol* (2019) 15(6):556–9. doi: 10.1038/s41589-019-0277-7

64. Chen S, Wang Y, Pan Y, Liu Y, Zheng S, Ding K, et al. Novel role for tranilast in regulating NLRP3 ubiquitination, vascular inflammation, and atherosclerosis. *J Am Heart Assoc* (2020) 9(12):e015513. doi: 10.1161/JAHA.119.015513

65. Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis* (2019) 10(2):128. doi: 10.1038/s41419-019-1413-8

66. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* (2002) 10(2):417–26. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3

67. Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* (2006) 126(4):659–62. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.002

68. Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* (2012) 13(4):325–32. doi: 10.1038/ni.2231

69. Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* (2006) 126(6):1135–45. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.033

70. Paoletti A, Raza SQ, Voisin L, Law F, Pipoli da Fonseca J, Caillet M, et al. Multifaceted roles of purinergic receptors in viral infection. *Microbes Infect* (2012) 14 (14):1278–83. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.010

71. Matuck BF, Dolhnikoff M, Duarte-Neto AN, Maia G, Gomes SC, Sendyk DI, et al. Salivary glands are a target for SARS-CoV-2: a source for saliva contamination. *J Pathol* (2021) 254(3):239–43. doi: 10.1002/path.5679

72. Glowacka I, Bertram S, Herzog P, Pfefferle S, Steffen I, Muench MO, et al. Differential downregulation of ACE2 by the spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus NL63. *J Virol* (2010) 84(2):1198–205. doi: 10.1128/JVI.01248-09

73. Sefik E, Israelow B, Mirza H, Zhao J, Qu R, Kaffe E, et al. A humanized mouse model of chronic COVID-19. *Nat Biotechnol* (2022) 40(6):906–20. doi: 10.1038/s41587-021-01155-4

74. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-coV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* (2022) 20(5):270–84. doi: 10.1038/s41579-022-00713-0

75. Aymonnier K, Ng J, Fredenburgh LE, Zambrano-Vera K, Munzer P, Gutch S, et al. Inflammasome activation in neutrophils of patients with severe COVID-19. *Blood Adv* (2022) 6(7):2001–13. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005949

76. Leppkes M, Knopf J, Naschberger E, Lindemann A, Singh J, Herrmann I, et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine* (2020) 58:102925. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102925

77. Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Nascimento DC, et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med* (2020) 217(12):e20201129. doi: 10.1101/2020.06.08.20125823

78. Kroemer A, Khan K, Plassmeyer M, Alpan O, Haseeb MA, Gupta R, et al. Inflammasome activation and pyroptosis in lymphopenic liver patients with COVID-19. *J Hepatol* (2020) 73(5):1258–62. doi: 10.1016/j.jhep.2020.06.034

79. Junqueira C, Crespo A, Ranjbar S, de Lacerda LB, Lewandrowski M, Ingber J, et al. FcgammaR-mediated SARS-CoV-2 infection of monocytes activates inflammation. *Nature* (2022) 606(7914):576–84. doi: 10.1038/s41586-022-04702-4

80. Silvin A, Chapuis N, Dunsmore G, Goubet AG, Dubuisson A, Derosa L, et al. Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. *Cell* (2020) 182(6):1401–18. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.002

81. Simard JC, Cesaro A, Chapeton-Montes J, Tardif M, Antoine F, Girard D, et al. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF-kappaB(1.). *PloS One* (2013) 8 (8):e72138. doi: 10.1371/journal.pone.0072138

82. Basiorka AA, McGraw KL, Eksioglu EA, Chen X, Johnson J, Zhang L, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a driver of the myelodysplastic syndrome phenotype. *Blood* (2016) 128(25):2960–75. doi: 10.1182/blood-2016-07-730556

83. Baggen J, Vanstreels E, Jansen S, Daelemans D. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. *Nat Microbiol* (2021) 6(10):1219–32. doi: 10.1038/s41564-021-00958-0

84. Zeng J, Xie X, Feng XL, Xu L, Han JB, Yu D, et al. Specific inhibition of the NLRP3 inflammasome suppresses immune overactivation and alleviates COVID-19 like pathology in mice. *EBioMedicine* (2022) 75:103803. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103803

85. Lee W, Ahn JH, Park HH, Kim HN, Kim H, Yoo Y, et al. COVID-19-activated SREBP2 disturbs cholesterol biosynthesis and leads to cytokine storm. *Signal Transduct Target Ther* (2020) 5(1):186. doi: 10.1038/s41392-020-00292-7

86. Wang R, Simoneau CR, Kulsuptrakul J, Bouhaddou M, Travisano KA, Hayashi JM, et al. Genetic screens identify host factors for SARS-coV-2 and common cold coronaviruses. *Cell* (2021) 184(1):106–19 e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.004

87. Schneider WM, Luna JM, Hoffmann HH, Sanchez-Rivera FJ, Leal AA, Ashbrook AW, et al. Genome-scale identification of SARS-coV-2 and pan-coronavirus host factor networks. *Cell* (2021) 184(1):120–32 e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.12.006

88. Stokes L, Layhadi JA, Bibic L, Dhuna K, Fountain SJ. P2X4 receptor function in the nervous system and current breakthroughs in pharmacology. *Front Pharmacol* (2017) 8:291. doi: 10.3389/fphar.2017.00291

89. Guo C, Masin M, Qureshi OS, Murrell-Lagnado RD. Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* (2007) 72(6):1447–56. doi: 10.1124/mol.107.035980

90. Caly L, Druce JD, Catton MG, Jans DA, Wagstaff KM. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res* (2020) 178:104787. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104787

91. Naggie S, Boulware DR, Lindsell CJ, Stewart TG, Gentile N, Collins S, et al. Effect of ivermectin vs placebo on time to sustained recovery in outpatients with mild to moderate COVID-19: A randomized clinical trial. *JAMA* (2022) 328(16):1595–603. doi: 10.1001/jama.2022.18590

92. Caricchio R, Abbate A, Gordeev I, Meng J, Hsue PY, Neogi T, et al. Effect of canakinumab vs placebo on survival without invasive mechanical ventilation in patients hospitalized with severe COVID-19: A randomized clinical trial. *JAMA* (2021) 326(3):230–9. doi: 10.1001/jama.2021.9508

93. Kyriazopoulou E, Poulakou G, Milionis H, Metallidis S, Adamis G, Tsiakos K, et al. Early treatment of COVID-19 with anakinra guided by soluble urokinase plasminogen receptor plasma levels: a double-blind, randomized controlled phase 3 trial. *Nat Med* (2021) 27(10):1752–60. doi: 10.1038/s41591-021-01499-z

94. group C-C. Effect of anakinra versus usual care in adults in hospital with COVID-19 and mild-to-moderate pneumonia (CORIMUNO-ANA-1): a randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* (2021) 9(3):295–304. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30556-7

95. Matusali G, Trionfetti F, Bordoni V, Nardacci R, Falasca L, Colombo D, et al. Pleural mesothelial cells modulate the inflammatory/profibrotic response during SARS-coV-2 infection. *Front Mol Biosci* (2021) 8:752616. doi: 10.3389/fmolb.2021.752616

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)

Titre : Caractérisation des bases moléculaires et cellulaires de la reprogrammation fonctionnelle radio-induite des macrophages.

Mots clés : Macrophages, radiothérapie, récepteurs purinergiques, reprogrammation fonctionnelle

Résumé : Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont d'importants composants cellulaires du microenvironnement tumoral, qui présentent des fonctions immunosuppressives et sont associés à un mauvais pronostic dans la plupart des cancers. La reprogrammation fonctionnelle de ces macrophages aux propriétés pro-tumorales vers un phénotype pro-inflammatoire aux propriétés anti-tumorales favorise le développement d'une réponse anti-tumorale. Notre équipe a récemment étudié la capacité des radiations ionisantes à reprogrammer les TAMs vers un phénotype pro-inflammatoire. L'augmentation de la capacité des rayonnements ionisants à reprogrammer les TAMs en macrophages pro-inflammatoires est un objectif à atteindre pour améliorer l'efficacité des traitements du cancer.
C'est dans ce contexte que mes travaux de thèse ont permis (i) de poursuivre la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la reprogrammation radio-induite des macrophages, (ii) d'identifier le rôle du récepteur purinergique P2Y2 comme un modulateur négatif de la reprogrammation pro-inflammatoire des macrophages et de caractériser les bases moléculaires de ce processus biologique et (iii) de proposer d'inhiber l'activité biologique du récepteur purinergique P2Y2, afin d'augmenter la capacité des rayonnements ionisants à déclencher l'activation pro-inflammatoire des macrophages.

Title: Characterization of the molecular and cellular bases of radiation-induced macrophage reprogramming in cancer treatment.

Keywords: Macrophages, radiotherapy, purinergic receptors, functional reprogramming

Abstract: Tumor-associated macrophages (TAMs) are key components of the tumor microenvironment that display immunosuppressive functions and are associated with poor prognosis in most cancers. The functional reprogramming of these macrophages with pro-tumor properties towards a proinflammatory phenotype with anti-tumor properties promotes the development of an anti-tumor response. Our team recently studied how ionizing radiation modulates macrophage reprogramming towards a proinflammatory phenotype. Increasing the ability of ionizing radiation to reprogram TAMs into proinflammatory macrophages is a key objective to improve the effectiveness of cancer treatments.
In this context, my thesis work enabled (i) to further characterize the molecular mechanisms involved in the radiation-induced macrophage reprogramming, (ii) to identify the role of the purinergic receptor P2Y2 as a negative modulator of the proinflammatory reprogramming of macrophages and to characterize the molecular bases of this biological process, and (iii) to propose the inhibition of the biological activity of P2Y2 receptor, to increase the ability of ionizing radiation, triggering the pro-inflammatory activation of macrophages.