



HAL
open science

L'Interleukine 34 produite dans le pancréas, régule l'inflammation locale

Chloé Delépine

► **To cite this version:**

Chloé Delépine. L'Interleukine 34 produite dans le pancréas, régule l'inflammation locale. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2023. Français. NNT : 2023ANGE0042 . tel-04891346

HAL Id: tel-04891346

<https://theses.hal.science/tel-04891346v1>

Submitted on 16 Jan 2025

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.

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



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

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



Remerciements

Je tiens avant tout à remercier les membres de mon jury, merci au Docteur Sonia Lamandé et au Docteur Jean-Sébastien Annicotte d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Un merci également au Professeure Alexandra Ducancelle, au Professeur Alain Morel, au Docteur Sarah Dion et au Docteur Emmanuel Garcion d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de participer à ce jury de thèse. Merci aussi au Professeur émérite Alain Morel d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que membre invité.

Je voudrais remercier le Docteur Dorothée Duluc et le Docteur Soazig Lelay pour leur bienveillance et leurs conseils apportés lors de mes comités de suivi de thèse.

Je souhaite également remercier le Professeure Pascale Jeannin et le docteur Yves Delneste de m'avoir accueilli au sein du laboratoire dans un premier temps en stage puis en thèse. Pour sa disponibilité, ses conseils avisés et sa participation aux corrections de ce manuscrit, je remercie particulièrement le Docteur Yves Delneste.

Un immense merci au Docteur Céline Beauvillain d'avoir accepté d'être de mon encadrante tout d'abord en stage puis pendant ces trois années de thèse. Merci pour votre bienveillance, votre gentillesse, votre écoute, vos conseils et votre présence chaque fois que j'en ai eu besoin tout au long de ces années. Je vous remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance pour porter ce projet de recherche.

Je suis reconnaissante envers toutes les personnes qui ont de près ou de loin, ont contribué à l'avancé de mon projet de recherche. Merci aux membres de l'équipe du Docteur Jean-Sébastien Annicotte pour leur accueil chaleureux lors de ma venue et un merci particulier au Docteur Emilie Courty de m'avoir transmis son savoir pour que les îlots pancréatiques n'aient plus de secret pour moi.

Ces trois années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans la présence de mes collègues de l'équipe 4 « Immunité Innée et cancer ». Votre bonne humeur quotidienne et votre soutien dès que j'en ai eu le besoin ont été essentiels dans la réussite de cette thèse. Merci à Najia et Raffaella pour votre gentillesse et votre écoute (et merci aussi pour vos petits plats Italiens et Marocains qui ont souvent été d'un vrai réconfort). Merci Simon pour tous tes petits tips informatiques. Nos échanges animés pendant la pause du midi vont me manquer. Merci à mes collègues de bureau Laurence, Nathalie et Coralie d'avoir supportées mes soufflements et mes plaintes intempestives et merci pour tous ces moments de rigolade. Laurence, je te remercie tout d'abord pour ton aide pour l'aboutissement de ce

projet, mais surtout pour ton écoute, ta gentillesse et ta présence chaque fois que j'en ai eu besoin. Nos conversations et nos debriefs shoppings hebdomadaires vont me manquer. Pascale alias Pascalou, merci pour ton soutien sans faille jusqu'à la fin. Merci d'avoir été une oreille attentive pour tous mes petits coups de blues et merci de ta gentillesse. J'espère que nos tête-à-tête matinaux ne vont pas trop te manquer (moi oui !).

Les rencontres de labos peuvent conduire à des amitiés qu'on n'aurait pas imaginées. Je remercie mes copains Benoît et Chloé (alias les bibis), Maxime, Marie et Marine pour leur soutien. Tous nos délires, nos petits verres après le travail (avec modération bien sûr), nos week-ends m'ont fortement aidé à décompresser de ces années chargées. Au plaisir de se retrouver pour les foulées du Gois 2024 !

Une mention particulière pour mon binôme Marine. Qui aurait cru que notre amitié verrait le jour une semaine avant notre premier stage dans ce laboratoire autour d'une raclette bien évidemment ! Merci d'avoir partagé ce quotidien semé d'embûches, d'être à l'écoute chaque fois que j'en ai besoin et d'avoir toujours les bons mots. Nos petits rituels café matinaux et notre tea-time bavardages vont me manquer (heureusement que les notes vocales existent).

Un grand merci à mes copains d'avoir été présents et de m'avoir épaulé pendant ses longues années d'études. Merci à tous mes amis angevins pour tous ces moments inoubliables ponctués de bonne humeur et de rires. Merci Lucas d'avoir cherché à comprendre ce sur quoi je travaillais et pour tes appels téléphoniques réguliers pour prendre de mes nouvelles. Merci Mathias pour tous tes dépannages informatiques, pour nos petites sessions de sport et pour tes conseils toujours précieux. Nico, malgré nos chamailleries frère-sœur intempestives j'ai toujours pu compter sur toi et pour cela je t'en remercie.

À Léa, mon expatriée australienne préférée, je suis reconnaissante pour toutes ces années d'amitié dictées par de la bonne humeur, de la rigolade, de la fête, de l'écoute et des bons conseils qui m'ont aidé à appréhender plus sereinement les soucis quotidiens.

La meilleure pour la fin, un grand merci à mon acolyte de toujours Mannon. De nos premières années de licence en passant par ce semestre dublinois inoubliable et nos voyages ponctués d'anecdotes en tout genre, il fallait bien que l'on se lance dans un doctorat ensemble (bon par contre une quatrième année, c'était trop me demander). Merci de toujours me suivre dans mes idées parfois farfelues (je suis sûre que l'année prochaine, pékin express, c'est pour nous !), merci d'être aussi drôle, merci pour ta bonne humeur et surtout merci de toujours répondre présente depuis toutes ces années.

Pour finir, je remercie infiniment toute ma famille formidable pour être qui ils sont et pour être toujours présents pour moi. Merci en particulier à mon frère Corentin qui malgré nos différences est toujours là quand j'en ai besoin. Je vous remercie toi et Léna de vous être toujours intéressé à mes projets de recherches. À mes parents, ces quelques mots pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissante pour tout ce que vous faites pour moi. Je voudrais commencer par vous remercier pour l'éducation que vous m'avez donnée qui m'a permis d'acquérir des valeurs qui je l'espère vous rendent fiers. Merci également d'avoir toujours fait en sorte que je puisse réaliser mes objectifs de vies qui sont notamment passés par ces nombreuses années d'études. Je vous remercie de toujours me soutenir malgré mon caractère pas toujours facile en particulier ces derniers mois. Votre amour et vos encouragements ont été essentiels dans l'accomplissement de ce doctorat et pour cela un grand merci.

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	1
Introduction.....	1
I. Le système immunitaire en action	1
1. Les récepteurs de l'immunité innée	2
a. Les PRRs membranaires	3
b. Les récepteurs intracellulaires.....	4
c. Les récepteurs solubles	4
2. Les cellules de l'immunité innée	5
a. Les granulocytes : neutrophiles, basophiles, éosinophiles	7
i. Les neutrophiles	7
ii. Les éosinophiles.....	7
iii. Les basophiles.....	7
b. Les mastocytes	8
c. Les cellules myéloïdes mononucléaires	8
d. Les cellules lymphoïdes de l'immunité innée.....	9
3. La phagocytose.....	10
4. La réaction inflammatoire	10
5. L'immunité entraînée.....	12
6. Les macrophages.....	12
a. Ontogénie des macrophages.....	13
b. Plasticité et polarisation des macrophages.....	14
c. Rôles des macrophages en situations pathologiques	16
7. Les cytokines.....	18
a. Généralités	18
b. Les cytokines pro et anti-inflammatoires :.....	19

II.	L'interleukine 34.....	20
1.	Les récepteurs de l'IL-34.....	21
a.	CD115	21
b.	PTP ζ :.....	22
c.	SDC1 :.....	23
2.	Expression tissulaire de l'IL-34	24
3.	IL-34 et différenciation des macrophages.....	24
a.	IL-34 et macrophages tissulaires	24
b.	IL-34 et polarisation macrophagique	25
c.	Rôle de l'IL-34 sur les TAMs.....	25
d.	IL-34 et cellules T	26
4.	L'IL-34 en conditions pathologiques.....	27
a.	L'IL-34 et maladies neurologiques.....	27
b.	L'IL-34 dans les maladies infectieuses.....	28
c.	L'IL-34 et la tolérance	30
d.	L'IL-34 dans les maladies auto-immunes	30
e.	L'IL-34 dans les maladies inflammatoires chroniques.....	31
i.	Maladies inflammatoires de l'intestin.....	31
ii.	Inflammation rénale.....	32
iii.	Fibrose hépatique.....	32
iv.	Endométriose	33
v.	Maladies métaboliques	33
III.	Le pancréas et la régulation du glucose.....	36
1.	Physiologie du pancréas.....	36
a.	Morphologie du pancréas humain et murin	36
b.	Régulation de l'homéostasie du glucose par le pancréas endocrine	37
2.	La cellule β du pancréas	38
3.	L'insuline.....	40

a.	Synthèse de l'insuline	41
b.	Action de l'insuline sur les tissus cibles.....	42
c.	La signalisation induite par l'insuline	43
d.	Les membres de la superfamille de l'insuline	44
IV.	L'obésité	45
1.	Structure du tissu adipeux :.....	45
a.	Fonctions métaboliques des adipocytes :	46
b.	Expansion du tissu adipeux en condition d'obésité	47
c.	Activité endocrine du tissu adipeux	47
2.	L'inflammation naissante dans le TAB.....	48
a.	Phénotype et rôle des macrophages du TAB dans l'inflammation associée à l'obésité ...	48
b.	Résistance à l'insuline induite par l'obésité et impact sur les fonctions du pancréas	50
V.	Impact de l'obésité sur le pancréas.....	50
1.	Le diabète de type 2	50
2.	L'obésité et les îlots de Langerhans	50
a.	L'inflammation chronique dans les îlots de Langerhans	50
b.	Obésité et morphologie des îlots pancréatiques	51
c.	Les macrophages dans le pancréas	53
i.	Macrophages et communication avec les cellules β	53
ii.	Les macrophages pancréatiques dans l'obésité et le diabète de type 2.....	54
VI.	Contexte et objectifs de la thèse.....	56
	Matériel et Méthodes	59
I.	Procédures d'expérimentations animales :.....	59
1.	Génération des souris IL-34 ^{ΔPdx} :.....	59
2.	Génotypage des lignées de souris :	59
3.	Test de tolérance au glucose :.....	60
4.	Test de tolérance à l'insuline :.....	60
5.	Dosage d'insuline :.....	60

6.	Mise en place du régime « High Fat Diet » (HFD) :.....	61
II.	Procédures expérimentales ex vivo :.....	61
1.	Isolement des îlots de Langerhans :.....	61
2.	Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose :.....	62
3.	Isolement des cellules immunitaires et cytométrie en flux	62
III.	Procédures expérimentales in vitro :	63
1.	Analyse tissulaire :.....	63
2.	ELISA :	64
3.	Etude de l'expression génique :	64
a.	Extraction d'ARN :.....	64
b.	Rétrotranscription et génération des ADNc :.....	64
c.	PCR quantitative (qPCR) :	64
IV.	Analyses statistiques :	66
	Résultats	68
	Discussion	103
1.	Production de l'IL-34 dans les îlots de Langerhans	103
2.	Validation du modèle de souris.....	104
3.	Conséquence de l'inhibition d'IL-34 sur l'inflammation locale	105
4.	Conséquence de l'inhibition de l'IL-34 et de l'inflammation sur les cellules β	107
5.	La metaflammation et l'expression d'IL-34.....	108
	Perspectives.....	111
	Références bibliographiques	113
	Production scientifique	134
1.	Articles.....	134
2.	Communications.....	134
a.	Orales.....	134
b.	Affichées	134
3.	Encadrement et enseignement	135

Table des figures

Figure 1 : Mécanismes de l'immunité innée et adaptative.....	1
Figure 2 : Classification des différents récepteurs de l'immunité innée (PPRs)..	2
Figure 3 : Production des cellules sanguines pendant l'hématopoïèse..	6
Figure 4 : Exemple d'une réaction inflammatoire suite à une lésion cutanée.	11
Figure 5 : Origine et développement des macrophages.	14
Figure 6 : Génération et polarisation des macrophages humains et murins.....	15
Figure 7 : Structure de l'Interleukine 34.	21
Figure 8 : Les voies de signalisations induites par l'IL-34.....	23
Figure 9 : Rôle direct et indirect de l'IL-34 au niveau cellulaire.....	27
Figure 10 : Résumé des actions de l'IL-34 en conditions pathologiques.....	35
Figure 11 : Anatomie du pancréas humain et murin..	37
Figure 12 : Régulation de la glycémie par les îlots pancréatiques	38
Figure 13 : Stimulation des cellules β pancréatiques et sécrétion d'insuline.....	40
Figure 14 : Synthèse et sécrétion de l'insuline.....	42
Figure 15 : Activation de la signalisation induite par l'insuline.....	44
Figure 16 : Conséquences métaboliques et inflammatoires de l'expansion du tissu adipeux en condition d'obésité.....	49
Figure 17 : Impact de l'obésité sur les tissus sensibles à l'insuline et sur la morphologie des îlots pancréatiques.....	52
Figure 18 : Ilots de Langerhans et inflammation au cours du développement du diabète de type 2..	55
Figure 19 : Schéma bilan de l'étude du rôle de l'IL-34 dans la physiologie du pancréas.....	69

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le génotypage des souris.....	60
Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage des différentes populations immunitaires.	63
Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour l'analyse de l'expression génique.	65

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Ag	Antigène
AMPC	Cyclic adenosine monophosphate
ATM	Adipose tissue macrophage
ATP	Adénosine triphosphate
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CLR	C-type lectin receptor
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CTGF	Connective tissue growth factor
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DC	Dendritic cell
DT1	Diabète de type 1
EGF	Epithelial growth factor
EGFR	Epithelial growth factor receptor
EMP	Erythromyeloid progenitor
ESC	Endometrial stromal cell
FAK	Focal adhesion kinase
GAG	Glycosaminoglycane
GLUT	Glucose transporter
GLP1R	Glucagon like peptide 1 receptor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GPR40	G-protein coupled receptor 40
HAND	HIV-associated neurocognitive disorders
HFD	High fat diet
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 alpha
IAAP	Islet amyloid polypeptide
IBD	Inflammatory bowel disease
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline

IGF	Insulin growth factor
IL	Interleukine
ILC	Innate lymphoid cell
IMC	Indice de masse corporelle
InsR	Insulin receptor
INRR	Insulin receptor-related receptor
IRS	Insulin receptor substrate
LB	Lymphocyte B
LDL	Low density protein
LES	Lupus érythémateux systémique
LPL	Lipoprotéine
LPMC	Lamina propria mononuclear cell
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
M ϕ	Macrophage
MAC	Membrane attack complex
MAIT	Mucosal-associated invariant T cell
MBL	Mannose binding lectin
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MEC	Matrice extracellulaire
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MMP	Métalloprotéase
MN	Mannose receptor
NET	Neutrophil extracellular trap
NK	Natural killer
NLR	NOD-like receptor
NO	Nitric oxide
NSG	NOD scid gamma
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGN	Peptidoglycane
PTX	Pentraxine
PTP ζ	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta

PRR	Pattern recognition receptor
RA	Rhumatoid arthritis
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RCH	Rectocolite hémorragique
RLR	RIG-like receptor
ROS	Reactive oxygen species
SDC	Syndecan
SNC	Système nerveux central
SR	Scavenger receptor
TAB	Tissu adipeux blanc
TAM	Tumor associated macrophage
TAV	Tissu adipeux viscéral
TASC	Tissu adipeux sous-cutané
TG	Triglycéride
TGF	Tumor growth factor
Th	T helper
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

Introduction

I. Le système immunitaire en action

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des organes, tissus, cellules et molécules qui assurent le maintien de l'homéostasie en procédant par l'élimination des cellules mortes et la protection de l'organisme contre les microbes. Les mécanismes de l'immunité sont schématiquement divisés en deux phases successives correspondant à l'immunité innée et à l'immunité adaptative.

L'immunité innée est la première ligne de défense de l'hôte et se caractérise par la reconnaissance des signaux de danger qu'ils soient d'origine endogène (cellules mortes ou molécules toxiques telles que l'acide urique) ou exogène (microbes). Les principales fonctions de l'immunité innée seront l'élimination du danger, l'initiation de l'inflammation dans le cas d'une infection et l'activation de l'immunité adaptative impliquant la reconnaissance d'antigènes par les lymphocytes T et B, supports de la mémoire immunitaire (Parkin and Cohen, 2001). (Cf figure 1)

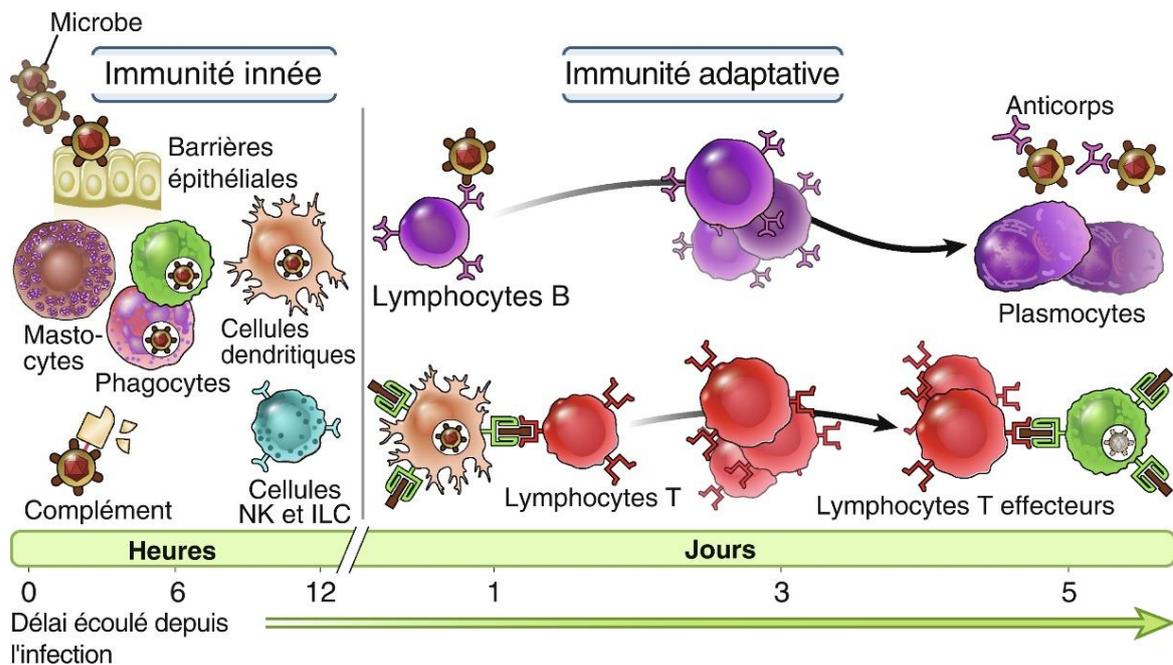


Figure 1 : Mécanismes de l'immunité innée et adaptative. L'immunité innée est la première ligne de défense en cas d'infection. Si les barrières épithéliales sont franchies, les cellules et les molécules de l'immunité innée résidentes dans les tissus (mastocytes, cellules phagocytaires, cellules dendritiques, facteurs solubles, lymphocytes innés) participent à l'élimination des microbes. La réponse immunitaire adaptative est initiée plus tardivement et repose sur les lymphocytes T et B et des facteurs solubles

qu'ils produisent. (D'après Abul K Abbas et al, *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*, 2020).

1. Les récepteurs de l'immunité innée

La première ligne de défense contre les microbes est assurée par les barrières épithéliales qui confèrent une résistance physique, chimique et biologique contre les pathogènes (Abbas, 2022; Medzhitov, 2007). Si ces barrières biologiques sont franchies par les microbes, les cellules de l'immunité innée présentes dans les tissus sous-jacents reconnaissent le danger et induisent une réponse inflammatoire. La détection des microbes est assurée par des récepteurs (*Pattern Recognition Receptors* ou PRRs) capables de reconnaître des motifs moléculaires spécifiquement exprimés par les microbes (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou PAMPs) (Medzhitov, 2007). La fonction des PRRs est distincte, notamment suivant leur localisation cellulaire (membranaire, cytoplasmique, extracellulaire) (Cf figure 2). De manière remarquable, les PRRs impliqués dans la reconnaissance des motifs microbiens sont également capables de reconnaître les motifs de danger endogènes, dont les prototypes sont les molécules exprimées à la surface ou sécrétées par les cellules mortes (apoptose tardive, NETose, nécrose) ; ces motifs sont appelés *Danger-Associated Molecular Patterns* ou DAMPs.

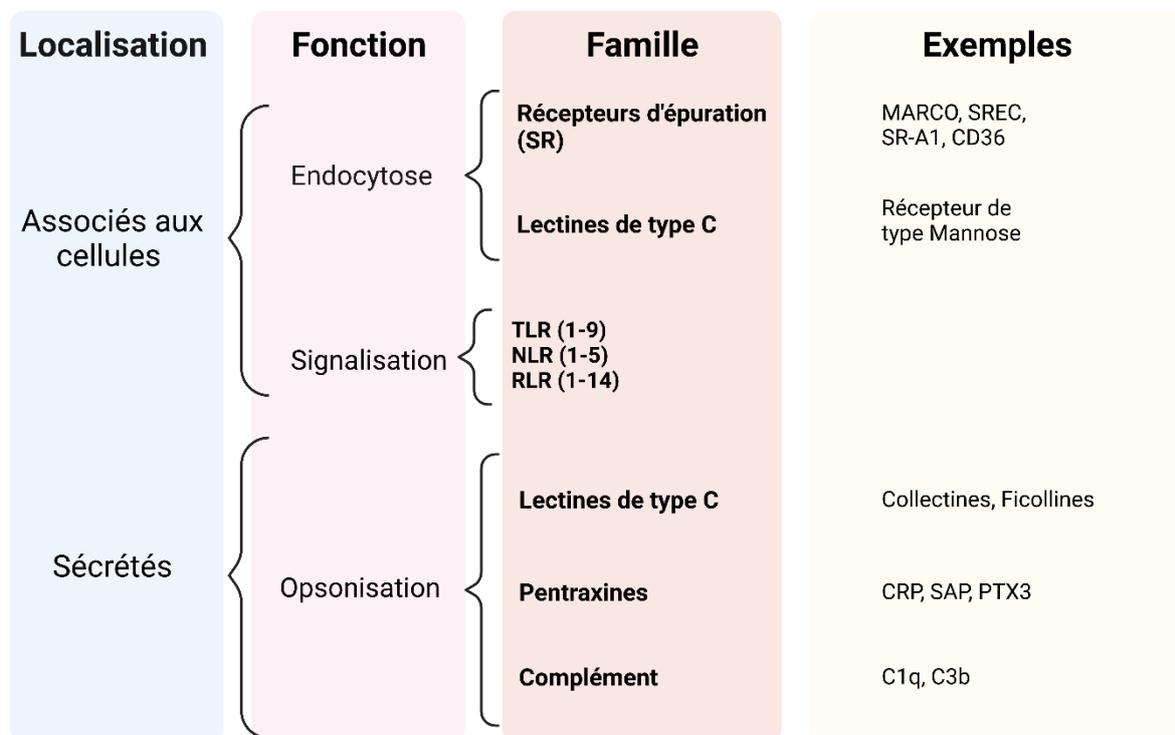


Figure 2 : Classification des différents récepteurs de l'immunité innée (PRRs). Les récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs peuvent être sécrétés ou

associés aux cellules. Les récepteurs associés aux cellules de la famille des récepteurs d'épuration (SR) et lectines de type C sont impliqués dans des mécanismes d'endocytose tandis que les PRRs de type TLR (*Toll-Like receptor*), NLR (*NOD-Like receptor*) et RLR (*RIG-Like receptor*) sont des récepteurs de signalisation. Les PRRs sécrétés favorisent l'opsonisation et comprennent certaines lectines de type C, les pentraxines et le complément. *Adapté du cours d'Immunologie du professeur Pascale Jeannin.*

a. Les PRRs membranaires

Les récepteurs membranaires des cellules de l'immunité innée sont impliqués dans l'endocytose et dans la phagocytose des microbes et des cellules mortes après la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs ainsi que dans la signalisation cellulaire de l'immunité. Parmi eux, se retrouvent notamment les récepteurs de type Toll (*Toll Like Receptors* ou TLRs). Ce sont des glycoprotéines membranaires composées d'un domaine extracellulaire contenant des motifs répétés riches en leucine (LRR) et d'un domaine homologue à l'interleukine 1 (TIR) cytoplasmique (Duan et al., 2022). En fonction de leur localisation, ils reconnaissent différents produits microbiens ou endogènes. Ainsi, les TLRs présents à la membrane (TLR-1, TLR-2 TLR-4 et TLR-5) identifient les composants de la paroi bactérienne alors que les TLRs localisés à la surface de la membrane endosomale détectent les acides nucléiques (TRL-3, TLR-7, TLR-8 et TLR-9) (Duan et al., 2022). Ces molécules sont impliquées notamment dans la production de médiateurs inflammatoires dont la nature est dépendante du type de TLRs engagés.

Les récepteurs aux lectines de type C (CLRs) sont des récepteurs membranaires impliqués dans la phagocytose et spécialisés dans la reconnaissance des carbohydrates. Ils possèdent au minimum un domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) au niveau de leur domaine lectine de type C (Li and Wu, 2021). Les récepteurs au mannose (MRs) ainsi que les récepteurs delectine 1 et 2 font partie des CLRs membranaires.

Enfin, les récepteurs d'épuration (*Scavengers réceptor* ou SR) constituent une famille de récepteurs hétérogènes classés en huit sous-groupes en fonction de leur structure. Bien qu'initialement identifiés de par leur rôle dans l'endocytose des lipoprotéines de basse densité (LDL) modifiées, il est aujourd'hui établi qu'ils reconnaissent un grand nombre de PAMPs (lipopolysaccharides, acide lipotéichoïque LTA, ADN bactériens...) (Areschoug and Gordon, 2009). Les SRs sont impliqués dans la phagocytose des microbes et des cellules mortes et peuvent également agir en tant que corécepteurs des TLRs (Taban et al., 2022).

b. Les récepteurs intracellulaires

Certaines bactéries ont développé des mécanismes d'échappement leur permettant d'entrer dans le cytoplasme cellulaire. De même, les virus se répliquent dans le milieu intracellulaire (Taban et al., 2022). Pour lutter contre ce type d'infection, les cellules possèdent des récepteurs intracellulaires.

Parmi ces récepteurs, les récepteurs de type NOD (*NOD-like receptor* ou NLR) constituent une large famille de 20 protéines intracellulaires avec une configuration du domaine peptidique commune, mais des fonctions différentes (Medzhitov, 2007). Tous les récepteurs de cette famille sont composés d'un domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides (NOD) et de répétitions de motifs riches en leucine dans la partie C-terminale. La fonction des récepteurs sera définie suivant la configuration du domaine N-terminal (Medzhitov, 2007; Takeuchi and Akira, 2010). En réponse à la reconnaissance de DAMPs ou de PAMPs, les NLRs sont capables de s'oligomériser pour former un inflammasome. C'est notamment le cas du NLRP3 dont l'oligomérisation entraîne la production des facteurs pro-inflammatoires (Takeuchi and Akira, 2010).

Les récepteurs de type RIG-I (*RIG-like receptor* ou RLR) sont activés par la reconnaissance des acides nucléiques viraux. Ils sont composés de deux domaines N-terminaux de recrutement des caspases (CARD) ainsi qu'un domaine central d'hélicase/ATPase et d'un domaine C-terminal de régulation. Cette famille inclut principalement trois membres : RIG-I qui se distingue par la présence sur son domaine C-terminal d'un motif répresseur RD lui donnant la capacité de s'auto-inhiber à l'inverse de MDA5 qui n'en possède pas. Le troisième membre, LGP2, ne possède pas de domaine CARD et joue notamment un rôle régulateur de la production d'interféron γ (INF γ) par RIG-I (Li and Wu, 2021; Takeuchi and Akira, 2010).

c. Les récepteurs solubles

Les récepteurs solubles se fixent aux bactéries et aux cellules mortes et favorisent leur phagocytose ; ils jouent ainsi un rôle de pont moléculaire entre ces motifs et les phagocytes, caractéristique qui justifie le terme d'opsonines qui leur est parfois attribué.

Les pentraxines constituent une famille de protéines multimériques qui se caractérisent par un domaine conservé de 200 acides aminés dans la région C-terminale (Vilahur and Badimon, 2015). Les pentraxines sont regroupées en fonction de la taille du domaine N-terminal : les pentraxines courtes CRP (protéine C réactive) et SAP (composant sérique de l'amyloïde P) et les pentraxines longues représentées par le prototype qui est la molécule PTX3 (pentraxine 3) (Deban et al., 2009). Les pentraxines reconnaissent une grande diversité de microbes et sont impliquées dans le processus d'efférocytose.

Les ficolines peuvent être soit produites par le foie et retrouvées dans la circulation, soit produites par les cellules pulmonaires et spléniques et sont alors retrouvées dans les tissus. Les ficolines sont impliquées dans l'activation du complément (voie des lectines), favorisant ainsi l'opsonisation des microbes donc leur élimination (Endo et al., 2007).

Les collectines sont des protéines effectrices de la famille des lectines. Il existe 9 collectines et, parmi celles-ci, 7 seront sécrétées (MBL, la conglutinine, SP-A et SP-DE, CL-43, CL-46, CL-K1) (Gupta and Surolia, 2007). Les collectines sont des oligomères de sous-unités trimériques. Chaque sous-unité est composée d'un court domaine N-terminal riche en cystéine, d'un domaine de type collagène, d'un court segment pouvant former des hélices en spirale et d'un CRD (Murugaiah et al., 2020).

Les protéines du complément font également partie des récepteurs solubles de l'immunité innée. Ce système est composé d'un ensemble de protéines plasmatiques qui vont opsoniser les microbes et les cellules mortes, facilitant ainsi leur phagocytose. En fonction des motifs reconnus, 3 voies distinctes du complément peuvent être activées : (i) la voie classique, qui est activée par la reconnaissance antigène-anticorps par C1q, (ii) la voie alterne, qui est initiée lorsque la protéine C3 reconnaît les polysaccharides bactériens, et (iii) la voie des lectines, qui est dépendante de la reconnaissance des résidus mannoses (Abbas et al., n.d.; Parkin and Cohen, 2001). Les trois voies activent la protéine C3 vers une voie commune et la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) par l'assemblage des protéines C5 et C9 (Abbas et al., n.d.).

2. Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée sont produites dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSHs sont capables de se différencier successivement en progéniteurs et en précurseurs qui donnent finalement naissance aux cellules myéloïdes et lymphoïdes (Cf Figure 3) (Comazzetto et al., 2021). Les cellules de l'immunité innée regroupent des cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes.

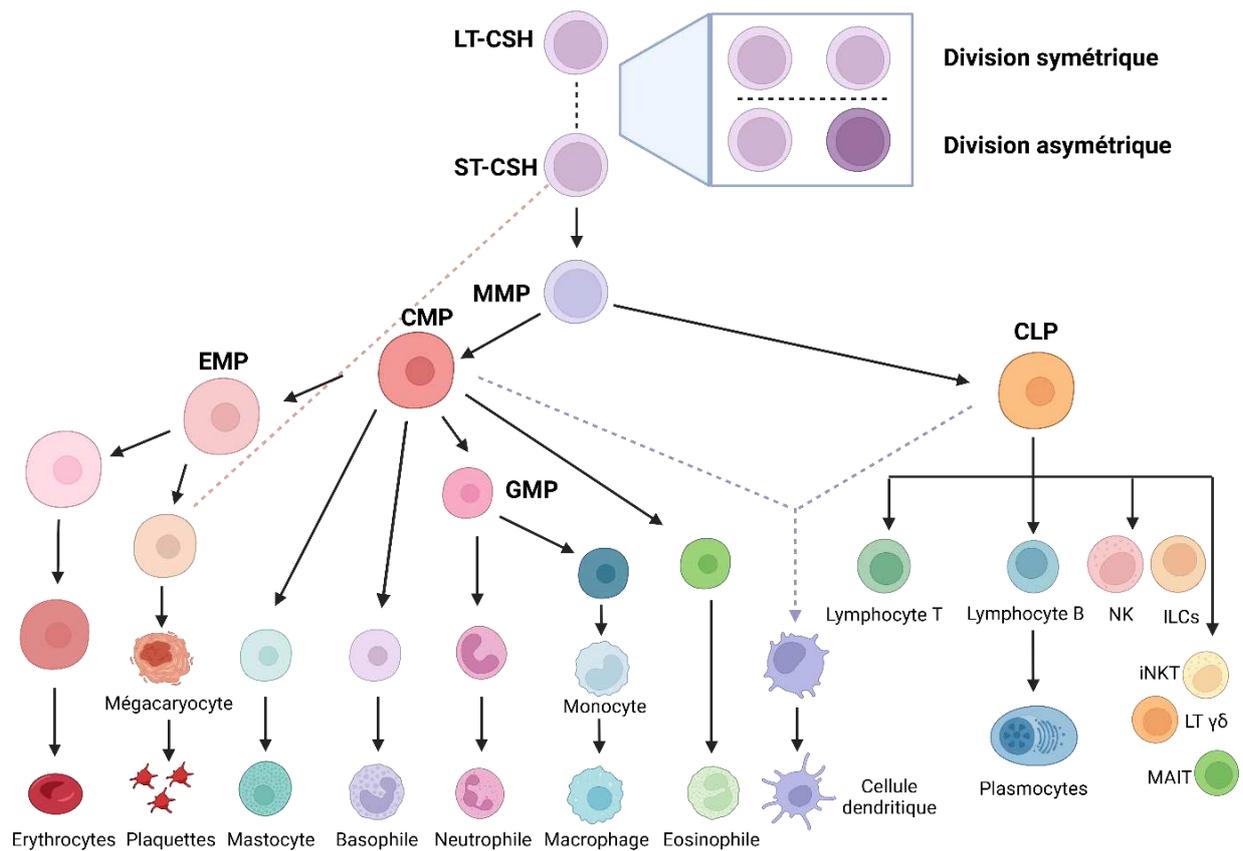


Figure 3 : Production des cellules sanguines pendant l'hématopoïèse. La cellule souche hématopoïétique (CSH) se différencie en cellule progénitrice myéloïde ou lymphoïde. La cellule progénitrice myéloïde se différencie pour donner naissance aux plaquettes, aux érythrocytes et autres leucocytes. D'autre part, la différenciation de la cellule progénitrice lymphoïde aboutit aux différents lymphocytes. Abréviations : Cellule souche hématopoïétique à long-terme (LT-CSH), Cellule souche hématopoïétique à court-terme (ST-CSH), Progéniteur Multipotent (MPP), Progéniteur Myéloïde Commun (CMP), Progéniteur Erythro-Mégakaryocytaire (EMP), Progéniteur Granulo-Monocytaire (GMP), Progéniteur Lymphoïde Commun (CLP). *Adapté de (Larsson et al 2005, Notta et al. 2016, Tusi 2018, Blank et Karlsson 2015).*

Les cellules immunitaires myéloïdes sont classées en deux groupes : les granulocytes (possédant un noyau polylobé) et les cellules myéloïdes mononucléées.

a. Les granulocytes : neutrophiles, basophiles, éosinophiles

i. Les neutrophiles

Les neutrophiles sont abondants dans le système sanguin puisqu'ils représentent 50 à 70% des leucocytes circulants chez l'homme et de 10 à 25% chez la souris. Ils se caractérisent par un noyau segmenté et un cytoplasme riche en granules et vésicules sécrétoires (Mantovani et al., 2011). Les neutrophiles seront les premiers leucocytes recrutés sur les sites inflammatoires (mécanisme expliqué plus en détail par la suite) afin d'éliminer les microbes. Ils disposent de trois mécanismes permettant l'élimination des motifs reconnus : (i) la phagocytose, (ii) la libération de médiateurs néoformés, tels que des radicaux libres ou préformés, comme les médiateurs contenus dans des granules cytoplasmiques et (iii) la formation des NETs, qui sont constitués d'un réseau d'ADN génomique libéré lors de la mort des neutrophiles (NETose) et auxquels sont attachés les molécules cytotoxiques des granules (Abbas, 2022; Liew and Kubes, 2019). Les granules azurophiles contiennent des enzymes comme la myéloperoxydase, des élastases, des protéinases et des défensines. Les autres granules contiennent la lactoferrine et des enzymes telle que la gélatinase nécessaires à la dégradation de la matrice extracellulaire.

ii. Les éosinophiles

Les éosinophiles se caractérisent par un noyau bilobé et la présence de granules cytoplasmiques. Ils sont présents en faible nombre dans la circulation sanguine (1 à 4%) et jouent un rôle majeur dans les réponses antiparasitaires (notamment contre les helminthes) et d'hypersensibilité (Shamri et al., 2011). Leurs granules cytoplasmiques renferment différents médiateurs cytotoxiques comme le protéoglycane 2 et la protéine cationique des éosinophiles (ECP) ou encore des peroxydases (Wechsler et al., 2021).

iii. Les basophiles

Les basophiles sont présents en faible quantité dans la circulation sanguine et ont souvent été confondus avec les mastocytes du fait de l'expression du récepteur aux Immunoglobulines E (IgE). Leur activation induit la libération de nombreux médiateurs, et notamment de l'histamine qui est impliquée dans les réactions allergiques et dans l'immunité antiparasitaire (Miyake et al., 2021).

b. Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules myéloïdes qui terminent leur maturation dans les tissus périphériques, notamment la peau et les muqueuses. Ces cellules se caractérisent par la présence dans le cytoplasme d'un grand nombre de granules contenant des médiateurs comme la tryptase et l'histamine. Comme les basophiles, ils présentent à leur surface le récepteur aux IgE FcεR1 et vont participer aux réponses allergiques au niveau tissulaire. Les mastocytes sont également capables de libérer des médiateurs à l'origine de la stimulation de mucus (Parkin and Cohen, 2001).

c. Les cellules myéloïdes mononucléaires

Les macrophages (Leur rôle sera décrit en détail par la suite.) et les cellules dendritiques sont des cellules myéloïdes mononucléaires issues de la différenciation des monocytes.

Les monocytes, produits à partir des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse, circulent dans le sang pendant 1 à 3 jours, puis migrent dans les tissus (Ginhoux and Jung, 2014; Monga et al., 2022).

Le développement et la survie des monocytes dépendent de facteurs de survie (GM-CSF, M-CSF, IL-34). Chez l'homme, les monocytes représentent 2 à 8% des globules blancs. Trois principales sous-populations de monocytes ont été identifiées : les monocytes classiques (CD14⁺⁺, CD16⁻), les monocytes intermédiaires (CD14⁺⁺, CD16⁺), et les monocytes non classiques (CD14⁺, CD16⁺⁺). Ces sous-populations présentent des différences fonctionnelles, telles que leurs réponses inflammatoires et le potentiel de migration (Kratofil et al., 2017). Différentes sous-populations de monocytes sont également retrouvées chez la souris (4% des leucocytes circulants) avec les monocytes conventionnels qui expriment fortement Ly6C, CCR2 et faiblement CX3CR1 (Ly6C^{hi}, CCR2^{hi}, CX3CR1) à l'inverse des monocytes non conventionnels qui expriment faiblement Ly6C, CCR2 et fortement CX3CR1 (Ly6C^{lo}, CCR2^{lo}, CX3CR1^{hi}) (Kratofil et al., 2017). Au cours de l'inflammation, les monocytes sont recrutés dans les tissus où ils terminent leur maturation ; ils peuvent alors se différencier en macrophages sous l'action des signaux environnants (facteurs de croissance, cytokines, produits microbiens, pH...).

Les cellules dendritiques (DCs) ont été identifiées pour la première fois par Zanvil Cohn et Ralph Steinman dans une rate murine. Leur nom fait référence à la formation de dendrites. Les DCs constituent un groupe hétérogène de cellules immunitaires qui peuvent être classées en différentes sous-populations chez l'homme et la souris en fonction de leur ontogénie, de leurs caractéristiques phénotypiques, de leur distribution tissulaire et de leurs profils transcriptionnelles (Segura, 2022). Les DCs sont généralement divisées suivant leur ontogénèse cellulaire et moléculaire en DC conventionnelles ou classiques (cDC), comprenant les cDC1 et les cDC2 (CD11c⁺), les DCs plasmacytoïdes (pDC, CD11c⁻, CD123⁺) et en DCs dérivées des monocytes (mo-DC) (Mellman, 2013).

Ces cellules jouent un rôle de sentinelle du système immunitaire et orchestrent les réponses immunitaires en établissant le lien entre immunité innée et l'immunité adaptative (Fu et al., 2022). Au stade immature, les cellules dendritiques présentes dans les tissus scrutent en permanence leur environnement. Lors d'une rencontre avec un microbe, les DCs migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour exercer leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles et primo-activer les lymphocytes T naïfs afin d'initier la réponse immunitaire adaptative (Mellman, 2013). Les pDCs représentent 0,1 à 0,5% des cellules mononucléées du sang périphérique et sont générées à partir de progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes (Ye et al., 2020). Elles sont les principales cellules productrices d'IFN de type I et produisent également des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires. Les pDCs participent à l'immunité innée antivirale (Swiecki and Colonna, 2015). Enfin, les DCs dérivées des monocytes (moDC) représentent une sous-population de DC qui se différencie en réponse à des stimuli inflammatoires lors de leur recrutement sur les sites inflammatoires (Segura, 2022).

d. Les cellules lymphoïdes de l'immunité innée

Les lymphocytes dit « non conventionnels » résident en dehors des organes lymphoïdes et sont des composants de l'immunité innée (Fan and Rudensky, 2016). Parmi ces cellules, sont retrouvées, les cellules lymphoïdes innées (ILCs) comprenant les ILC1, ILC2, ILC3, ainsi que les cellules natural killers (NK) (Fan and Rudensky, 2016). Les cellules NK ont une fonction cytotoxique naturelle par la production de vésicules azurophiles riches en enzymes cytolytiques (perforines et granzymes) (Luci and Tomasello, 2008). Le rôle majeur des cellules NK est d'éliminer les cellules du soi transformées (cellules tumorales) et les cellules infectées. Pour cela, les NKs possèdent des récepteurs inhibiteurs de la cytotoxicité KIR qui reconnaissent les molécules du CMH de classe I à la surface des cellules du soi ainsi que des récepteurs activateurs KAR qui reconnaissent des molécules de stress (Carcelin, n.d.; Luci and Tomasello, 2008).

Les cellules T tueuses naturelles invariantes (iNKT), localisées dans les tissus, reconnaissent des lipides microbiens liés à la molécule apparentée au CMH-I CD1 (Abbas, 2022). Il existe également un groupe de cellules T invariantes associées aux muqueuses (MAIT) résidants essentiellement dans le foie et l'intestin. Enfin, les cellules T $\gamma\delta$ résident dans les barrières tissulaires et sont capables de produire une grande quantité d'INF γ et d'IL-17 (Fan and Rudensky, 2016).

L'ensemble de ces lymphocytes résidents sont capables de reconnaître une large variété de ligands microbiens et des signaux de l'organisme et vont agir par la production de facteurs régulant l'homéostasie tissulaire (Fan and Rudensky, 2016).

3. La phagocytose

La phagocytose est un mécanisme utilisé par les organismes unicellulaires à des fins nutritives alors qu'elle est principalement impliquée dans l'élimination d'agents particulaires dans les organismes multicellulaires (Rosales and Uribe-Querol, 2017). Les phagocytes incluent les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les DCs. Ces cellules sont ainsi capables d'ingérer des particules de dimension supérieure à 0,5 μm de diamètre, telles que les microbes et les cellules apoptotiques. La liaison du phagocyte à la particule, qu'elle soit directe ou indirecte (via les opsonines) entraîne un remodelage de la membrane et du cytosquelette pour internaliser la cible dans le phagosome. Ce dernier fusionne ensuite avec les lysosomes qui contiennent des enzymes lytiques pour former le phagolysosome. La cible, que ce soit un microbe ou bien des cellules apoptotiques, est finalement éliminée par les enzymes et les substances toxiques (ROS et NO) produites dans le phagolysosome (Rosales and Uribe-Querol, 2017; Abbas, 2022). La phagocytose des cellules apoptotiques est appelée efférocytose (littéralement, « emmenez les cellules à la tombe »). Les cellules apoptotiques présentent à leur surface des motifs « eat me » (phosphatidylsérine, calréticuline) reconnus par les phagocytes en particulier les macrophages. L'ingestion des cellules apoptotiques par les macrophages limite l'activation des lymphocytes T auto-réactifs par la production d'IL-10 et de TGF- β maintenant ainsi une tolérance périphérique (Boada-Romero et al., 2020).

4. La réaction inflammatoire

L'inflammation est une réaction de l'immunité innée induite suite à la reconnaissance d'une menace (infection ou lésion) afin d'initier une réponse adaptée pour éliminer le danger et d'initier une réparation tissulaire (Medzhitov, 2010, 2008; Varela et al., 2018). La détection des signaux de danger (exogènes ou endogènes) par les cellules épithéliales et/ou les cellules de l'immunité innée conduit à la production de médiateurs solubles (telles que les cytokines et les chimiokines comme CXCL8, CCL-2, CCL-5) impliqués dans le recrutement et l'activation de nombreux effecteurs cellulaires (Abbas, 2022; Medzhitov, 2008) (Cf figure 4). Ces signaux moléculaires participent à la vasodilatation et à la perméabilité vasculaire pour que les neutrophiles et les monocytes puissent rejoindre le site de l'infection. Ces mécanismes contribuent aux caractéristiques de l'inflammation que sont la rougeur, la chaleur, le gonflement et la douleur.

Lorsque les cellules de l'immunité innée arrivent au site inflammatoire, elles reconnaissent les motifs de danger présents sur le pathogène et participent à son élimination, notamment par phagocytose (Abbas, 2022). Une fois la menace disparue, les cellules immunitaires et plus particulièrement les macrophages vont participer à la réparation tissulaire par la production de facteurs de croissance stimulant la prolifération des cellules épithéliales et des fibroblastes nécessaires

à la cicatrisation, mais aussi par l'élimination des cellules mortes par phagocytose (Abbas, 2022). (Cf figure 4)

L'inflammation aiguë se développe rapidement et peut durer plusieurs jours. Si l'infection n'est pas éliminée après quelques jours ou si les lésions tissulaires se prolongent, l'inflammation aiguë peut laisser place à une inflammation chronique impliquée dans de nombreuses pathologies telles que le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde (Abbas et al., n.d.).

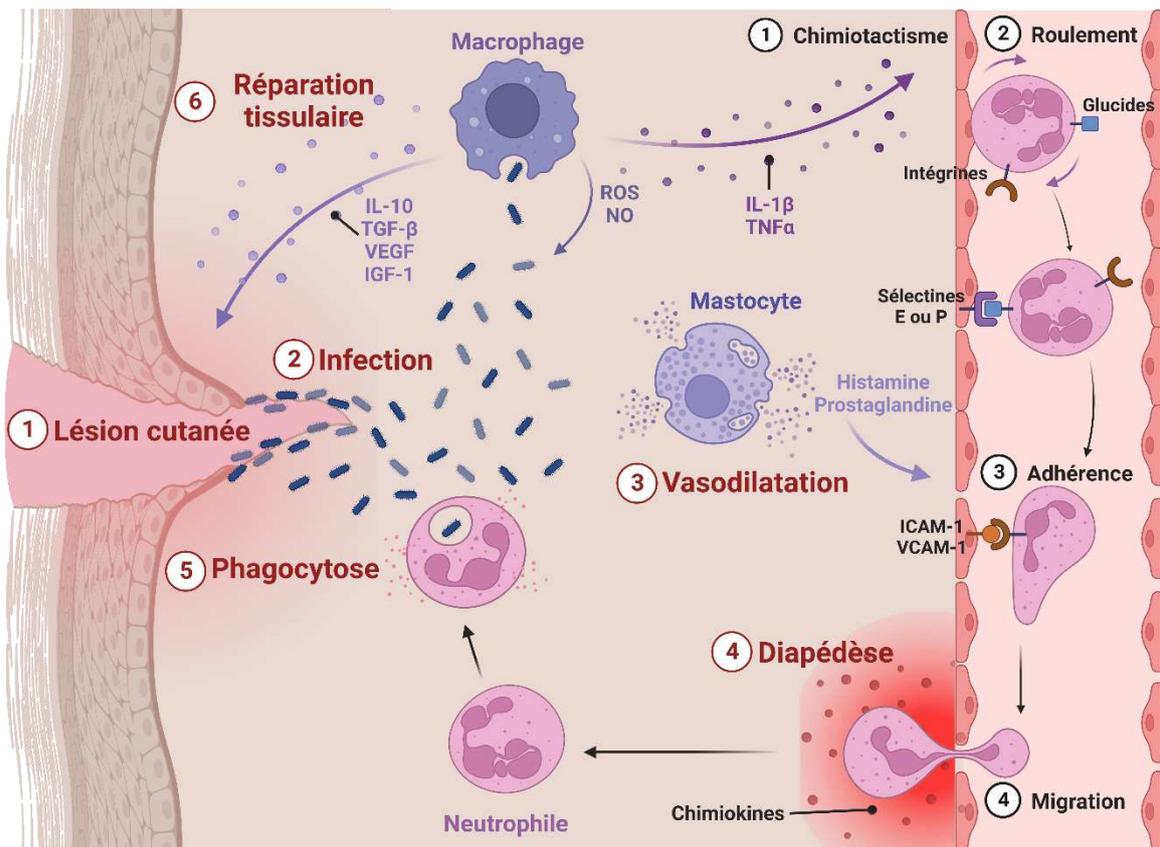


Figure 4 : Exemple d'une réaction inflammatoire suite à une lésion cutanée. Le passage de la barrière épithéliale induit l'infection par le microbe. La reconnaissance des motifs exprimés à sa surface entraîne l'activation des cellules de l'immunité notamment des mastocytes et des macrophages. Les macrophages participent au recrutement des neutrophiles par libération de cytokines pro-inflammatoires (chimiotactisme) et les mastocytes libèrent des médiateurs qui favorisent la vasodilatation. Une fois recrutés, les neutrophiles se fixent à l'endothélium et migrent dans le tissu où ils participent à l'élimination du microbe par phagocytose. Une fois la menace éliminée, les macrophages libèrent des facteurs diminuant l'inflammation et participant à la réparation tissulaire.

5. L'immunité entraînée

L'immunité entraînée ou « *trained immunity* » caractérise la capacité des cellules du système immunitaire innée, à acquérir une mémoire immunitaire (Netea et al., 2020). Ce nouveau concept a été démontré en 2012, lorsque des effets protecteurs non-spécifiques du vaccin Bacillus Calmette-Guérin (BCG) ont été rapportés chez des souris vaccinées (Kleinnijenhuis et al., 2012). Chez des souris présentant un déficit immunitaire combiné sévère, dépourvues de lymphocytes T et B, incapables de développer une réponse immunitaire adaptative, la vaccination par le BCG contre *Mycobacterium tuberculosis* leur a conféré une protection croisée et a réduit la mortalité causée par une infection létale à *Candida albicans*. Les souris vaccinées présentaient également une protection contre les infections ultérieures par *Listeria monocytogenes* et *Salmonella thymurium* (Blanden et al., 1969). Par la suite, de nombreuses études ont confirmé la mise en place d'une immunité entraînée dans le contexte de la vaccination par BCG ou après le contact avec des ligands de PRR tels que le β -glucane se fixant sur son récepteur dectine-1 (Domínguez-Andrés et al., 2023). L'induction d'une immunité entraînée jouerait un rôle important dans les effets antitumoraux du BCG (Lobo et al., 2021). L'immunité entraînée implique la majorité des cellules de l'immunité innée (les NK, les DCs, les lymphocytes de l'immunité innée, les neutrophiles) mais, elle a été décrite en premier lieu chez les monocytes et macrophages non seulement chez la souris, mais également chez l'humain. Domínguez-Andrés et al ont montré que 3 mois après la vaccination au BCG, les monocytes issus des patients produisent plus de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF α) lors d'un contact avec des pathogènes bactériens et fongiques (Domínguez-Andrés et al., 2023; Netea et al., 2020). Cette réponse secondaire augmentée est induite par des changements métaboliques, épigénétiques et transcriptionnels opérés lors de la première activation des cellules immunitaires innées (Domínguez-Andrés et al., 2023; Netea et al., 2020). Ces modifications, touchant également les cellules de la moelle osseuse, peuvent potentiellement expliquer la longévité de l'immunité entraînée observée dans la population sur des cohortes de patients vaccinés par le BCG (Nguipdop-Djomo et al., 2016).

6. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules phagocytaires et des cellules présentatrices d'antigènes, acteurs essentiels dans le contrôle des infections, dans l'élimination des débris cellulaires et dans la réparation tissulaire (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

a. Ontogénie des macrophages

Les macrophages ont été initialement décrits chez les invertébrés par Ilya Metchnikoff qui a caractérisé ces cellules comme des capteurs cellulaires et des guérisseurs d'infections et des lésions tissulaires (Gordon, 2007). Par la suite Van Furth et ses collègues ont établi en 1972 que les macrophages tissulaires étaient continuellement renouvelés à partir des monocytes circulants recrutés (Van Furth et al., 1972). Plus récemment, des analyses effectuées sur des embryons murins ont permis d'identifier que la majorité des macrophages résidents des tissus proviennent de précurseurs embryonnaires présents avant la naissance et qui se maintiennent à l'âge adulte (Epelman et al., 2014 ; Ginhoux and Guilliams, 2016; Ginhoux and Jung, 2014). L'hématopoïèse chez les mammifères se découpe en plusieurs vagues : l'hématopoïèse primitive se déroule au niveau des îlots sanguins du sac vitellin à partir du mésoderme de la plaque postérieure, donnant naissance aux érythroblastes, aux mégacaryocytes et aux macrophages qui diffusent dans l'embryon et plus particulièrement dans le foie fœtal lors de la mise en place de la circulation sanguine (Cf figure 5). Puis, au niveau du foie fœtal, les progéniteurs érythromyéloïdes (EMP) issus du sac vitellin se différencient en lignées multiples incluant les macrophages (Ginhoux and Guilliams, 2016). En parallèle, ces précurseurs vont coloniser la moelle osseuse pour donner naissance aux CSH chez l'adulte (Ginhoux and Guilliams, 2016; Ginhoux and Jung, 2014; Varol et al., 2015). À l'âge adulte, les macrophages résidents murins s'auto-renouvellent au niveau tissulaire de deux façons : à partir des macrophages implantés avant la naissance et à partir des monocytes recrutés du sang circulant suite à des réactions inflammatoires menaçant l'homéostasie tissulaire (Ginhoux and Jung, 2014; Hashimoto et al., 2013). Chez l'homme, le renouvellement des macrophages tissulaires à l'âge adulte provient du recrutement des monocytes par des signaux cytokiniques. En fonction de leur localisation anatomique et de leur phénotype fonctionnel, les macrophages résidents peuvent être divisés en sous-populations : la microglie définit les macrophages du système nerveux central (SNC), les ostéoclastes sont localisés dans les os, les cellules de Kupffer dans le foie et les cellules de Langerhans au niveau de la peau. (Cf figure 5)

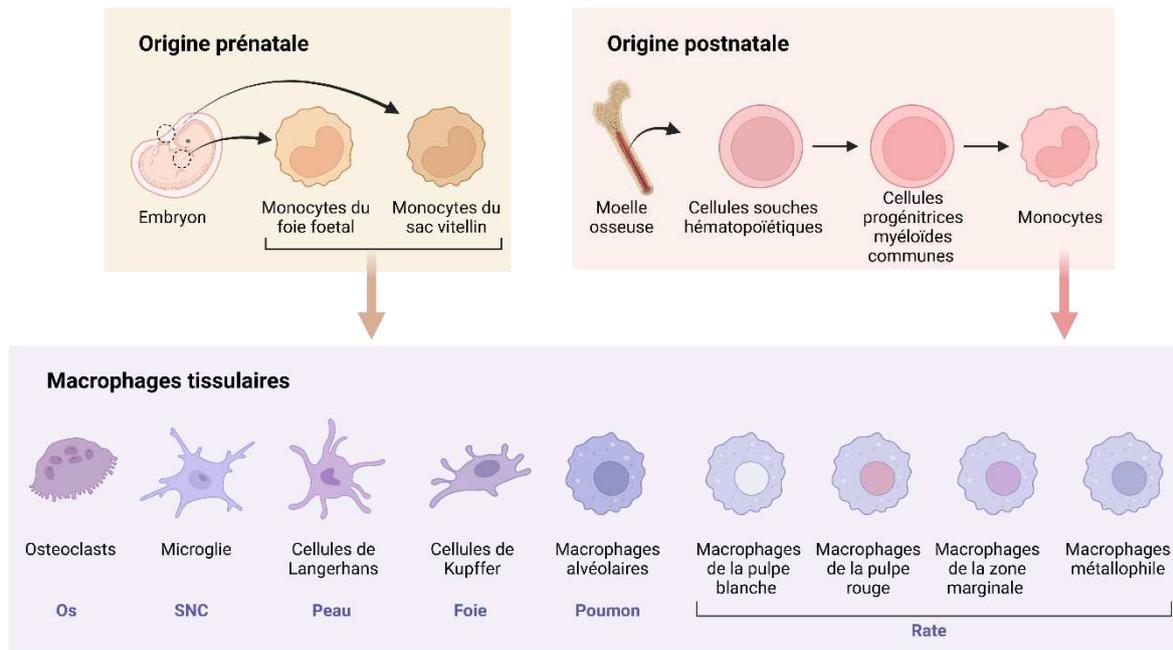


Figure 5 : Origine et développement des macrophages. Les macrophages tissulaires se développent dès le stade embryonnaire au niveau du sac vitellin ainsi que dans le foie foetal et finalement dans la moelle osseuse chez l’adulte. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules progénitrices myéloïdes qui elles-mêmes se différencient successivement en monocytes. Une fois recrutés, les monocytes activés se différencient en macrophages dans les tissus.

b. Plasticité et polarisation des macrophages

Les macrophages sont des cellules plastiques impliquées dans de nombreux processus telles que la défense antimicrobienne, la réparation tissulaire et la régulation des réactions immunitaires (Mosser and Edwards, 2008). Ils s’adaptent au microenvironnement local et ajustent leur phénotype fonctionnel pour répondre à la demande du tissu. Dans le but de les étudier plus précisément, les macrophages ont été classés en fonction de leurs marqueurs de surfaces, de la production de facteurs spécifiques et de leurs activités biologiques (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Cette classification suit une échelle linéaire opposant les macrophages dits M1 classiquement activés impliqués dans l’inflammation et dans la réponse aux infections comparativement aux macrophages M2 jouant un rôle dans la cicatrisation et dans la tolérance immunitaire.

Les macrophages M0 se polarisent en M1 sous l’action de l’INF γ , du GM-CSF ou encore du LPS. Ils sont caractérisés par leur capacité à produire des cytokines inflammatoires comme le TNF α , l’IL-1 β , l’IL-6, l’IL-12 et l’IL-23 et présentent une activité antimicrobienne et antitumorale (Mosser and Edwards, 2008). Les macrophages immunorégulateurs M2 se polarisent sous l’action des cytokines produites par les lymphocytes Th2 (IL-4 et IL-13). Ils peuvent être également polarisés sous l’action du

facteur de croissance M-CSF de même qu'en présence d'IL-34 (Foucher et al., 2013). Ils produisent de grandes quantités d'IL-10, mais régulent également à la baisse leur production d'IL-12 entrainant ainsi la diminution de l'inflammation. Les macrophages M2 sont immunorégulateurs et favorisent la réparation tissulaire et ont également des propriétés pro-angiogéniques (Mosser and Edwards, 2008; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). (Cf figure 6)

Les macrophages murins à la différence des macrophages humains présentent des marqueurs membranaires spécifiques combinés. Ainsi, les macrophages M1 murins F4/80⁺ polarisés sous l'action d'IFN γ ou de LPS expriment à leur surface du CD11c. L'IL-4 et l'IL-13 favorisent la différenciation des monocytes murins en macrophages de type M2 qui expriment spécifiquement le récepteur CD206 (Monnier et al., 2022). (Cf figure 6)

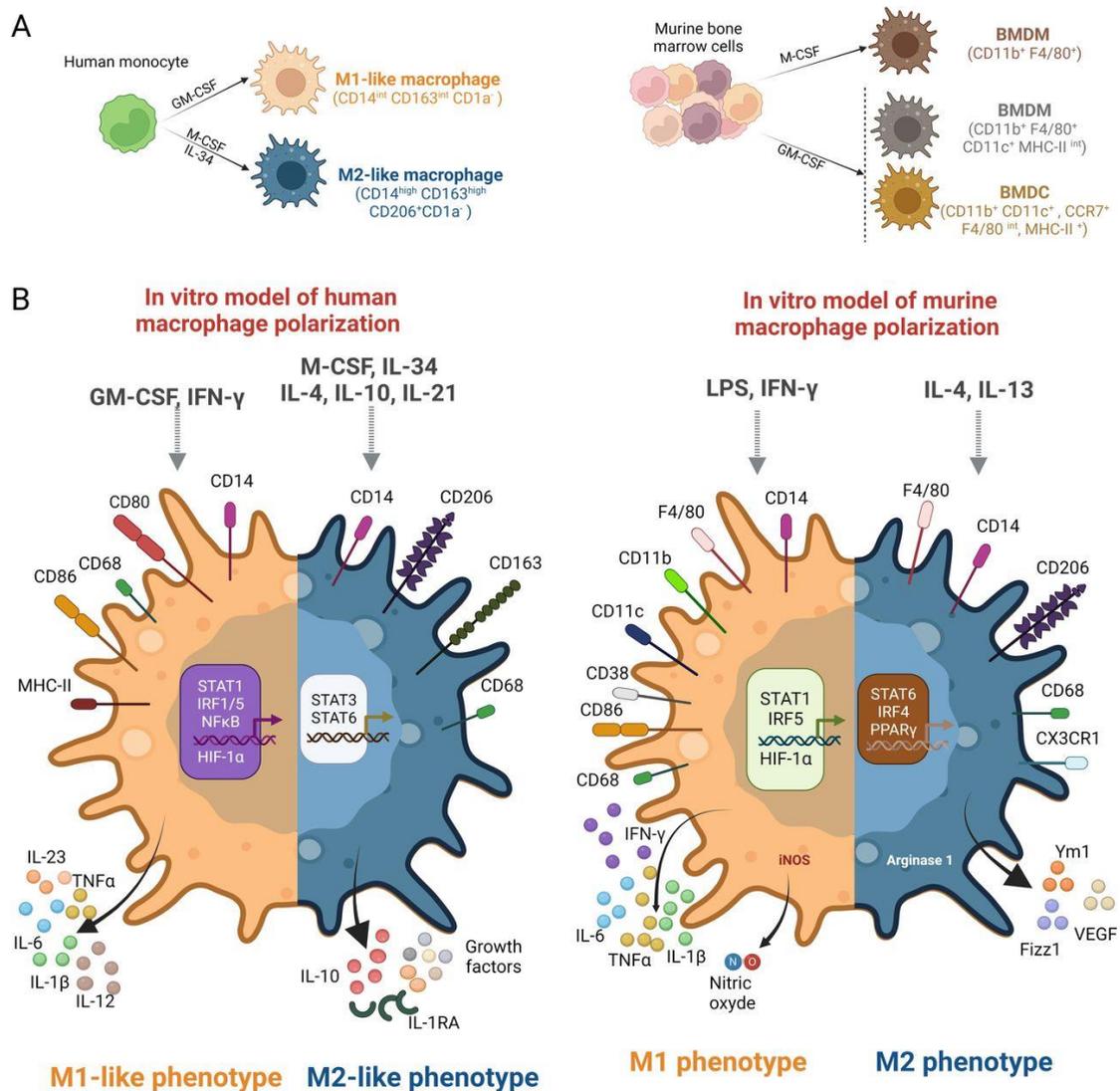


Figure 6 : Génération et polarisation des macrophages humains et murins. (A) Les macrophages humains (panel de gauche) sont générés en présence de différentes cytokines. Les macrophages de type M1 se différencient sous l'influence du GM-CSF à l'inverse des macrophages de type M2 qui se

polarisent sous l'action de l'IL-34 ou du M-CSF. Les macrophages murins (panel de droite) sont générés en présence de M-CSF à partir des cellules progénitrices de la moelle osseuse (BMDM). L'utilisation du GM-CSF favorise la formation de cellules dendritiques et de macrophages. **(B)** Représentation des marqueurs exprimés par les macrophages de type M1 et M2 humains (gauche) et murins (droite) ainsi que des cytokines produites par ces derniers. *Adapté de (Monnier et al., 2022).*

c. Rôles des macrophages en situations pathologiques

Les macrophages tissulaires ainsi que les monocytes nouvellement recrutés sont hiérarchiquement activés afin de maintenir une homéostasie tissulaire. (Murray and Wynn, 2011) Ainsi, ils sont positionnés de telle façon qu'ils sont en constante surveillance de possibles dommages tissulaires ou d'invasion par des microorganismes. Leur activité phagocytaire et l'expression de récepteurs de l'immunité innée comme les TLRs, les CLR, les SCs, les RLR ou encore les NLRs leur permettent de détecter le danger (Murray and Wynn, 2011). Dans le cadre d'une infection, les macrophages présentent un profil inflammatoire de type M1 sécrétant des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 et TNF α) qui favorisent la polarisation des lymphocytes Th17 notamment. Ils produisent également des métalloprotéases comme MMP2 et MMP9 responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire facilitant le recrutement d'autres cellules immunitaires à partir de la circulation sanguine. Leur implication dans la défense antimicrobienne passe également par la sécrétion de ROS et de NO. Cependant, ce profil phénotypique et sécrétoire peut-être responsable de l'apparition de lésions au niveau des tissus voisins si la réaction inflammatoire persiste dans le temps. Cette inflammation aberrante est retrouvée dans certaines maladies auto-immunes et inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique (LES) ou le diabète de type 1 (DT1) (Ross et al., 2021; Yang et al., 2023).

Une fois la menace éliminée, les cellules immunitaires présentes sur le lieu de l'infection sécrètent des facteurs (IL-4 et IL-13) responsables de la polarisation des macrophages en macrophages immunorégulateurs M2. Ces derniers sécrètent des protéines anti-inflammatoires comme l'arginase ou l'IL-10 capable d'inhiber la réponse des macrophages M1 initialement polarisés. L'IL-10 se fixe sur son récepteur IL-10R exprimé par les macrophages M1 et active la voie STAT3 inhibant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et des molécules d'adhésion impliquées dans la réaction inflammatoire (Saraiva et al., 2020). Les macrophages M2 jouent un rôle prépondérant dans la réparation tissulaire et la fibrose. Pour se faire, ils produisent des facteurs tel que le TGF- β et le PDGF ainsi que des métalloprotéases au niveau du site lésé (Murray and Wynn, 2011). Le TGF- β induit notamment la prolifération et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes producteurs de collagène nécessaire à la régénération du tissu (Braga et al., 2015; Lech and Anders, 2013). En parallèle,

les macrophages M2 éliminent les cellules mortes, les débris et les composants de la MEC par phagocytose (Murray and Wynn, 2011). L'altération de l'efférocytose peut entraîner l'accumulation de cellules nécrotiques, d'acides nucléiques et d'autres composants cellulaires immunogènes activant les macrophages environnants et pouvant contribuer à l'inflammation dans le lupus érythémateux systémique (LES) et les glomérulonéphrites, les maladies pulmonaires inflammatoires chroniques, l'athérosclérose et la sclérose en plaques (Morioka et al., 2019; Nagata, 2018).

De la même façon que pour les macrophages inflammatoires, un excès de macrophages M2 est associé à la genèse de pathologies fibrosantes (fibrose hépatique, fibrose pulmonaire idiopathique, sclérose systémique) (Lech and Anders, 2013). Les macrophages polarisés M2 ont des fonctions métaboliques importantes notamment dans le tissu adipeux où ils participent au maintien de la fonction des adipocytes, de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose. Dans le tissu adipeux, l'IL-4 et l'IL-3 activent la voie de signalisation STAT6 dans les adipocytes induisant l'expression du facteur de transcription PPAR γ favorisant la différenciation des macrophages M2 notamment par la régulation de l'arginase 1 (Odegaard et al., 2007). Une fois différenciés, les macrophages M2 produisent de l'IL-10 et de l'IL-1RA (antagoniste du récepteur à l'IL-1) qui inhibent le recrutement et la polarisation des macrophages de type M2 et participent au maintien de la sensibilité à l'insuline (Thomas and Apovian, 2017). Leur expression de protéines impliquées dans l'absorption des acides gras libres comme CD36 ou DGAT2 limite également la lipotoxicité, la résistance à l'insuline et l'inflammation (Shapiro et al., 2011). Ce profil phénotypique et métabolique est altéré dans le diabète de type 2 induit par une situation d'obésité (ce processus sera détaillé dans le chapitre III) (Murray and Wynn, 2011).

La plasticité des macrophages leur permet d'acquérir un large spectre de profils phénotypiques, métaboliques et fonctionnels vis-à-vis du microenvironnement. Les modifications environnementales observées lors de l'implantation d'une tumeur (hypoxie, fibrose et mort cellulaire excessive) sont associées à une réponse inadaptée des macrophages. En temps normal, les macrophages ont la capacité de tuer les cellules tumorales, de phagocyter et d'activer les lymphocytes. Mais, dans la plupart des tumeurs, les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) représentant la population immunitaire la plus abondante présentent des propriétés pro-tumorales et immunosuppressives. Une forte infiltration des TAMs est associée à un mauvais pronostic pour la majorité des tumeurs solides (Mantovani et al., 2022). Ils produisent de nombreux facteurs solubles favorables pour le microenvironnement tumoral : l'EGF et l'IL-6 (expansion des cellules cancéreuses), l'IL-1 et le TGF- β (propagation des métastases), le VEGF (facteur angiogénique) (Mantovani et al., 2022, 2022). En parallèle, ils jouent leur rôle immunosuppresseur par la sécrétion d'IL-10, de TGF- β ou de prostaglandines et expriment fortement les points de contrôles immunitaires reconnus par les

lymphocytes cytotoxiques et responsables de leur inactivation comme PDL-1, PDL-2 ou B7-H4 (Christofides et al., 2022; Mantovani et al., 2022).

7. Les cytokines

a. Généralités

Les cytokines sont des protéines solubles de faibles poids moléculaires (de 6 à 70 kDa) sécrétées par les cellules nucléées et jouant un rôle de médiateur important dans la réponse immunitaire (Liu et al., 2021). Les cytokines agissent en se liant à des récepteurs transmembranaires et membranaires spécifiques situés sur les cellules cible et en activant des cascades de signalisation intracellulaire en aval qui aboutissent généralement à une modulation de l'expression génique de la cellule cible. Une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et avoir des effets biologiques variés sur différentes cellules cibles (action pléiotrope). Certaines cytokines présentent des activités biologiques similaires (action redondante). Les cytokines sont aussi capables d'affecter la synthèse et l'activité d'autres cytokines de façon antagonistes, additives ou synergiques. Enfin, leur activité peut être exercée à distance (endocrine et paracrine) ou de façon juxtacrine (lors d'une synapse immunologique), mais également de façon autocrine ou intracrine ce qui fait de ce système de signalisation un système complexe (Liu et al., 2021; Zdravkovic et al., 2017). Les cytokines incluent les interleukines, les tumor necrosis factor (TNF), les interférons, les facteurs de croissance et de différenciation (TGF), les chimiokines et les adipokines.

Les interleukines sont regroupées dans une famille de 40 molécules, mais leur nombre ne cesse d'augmenter en fonction des découvertes. Ces dernières sont classées en sous-familles en fonction de leurs homologies de séquence, de leurs propriétés de liaison, de leurs fonctions biologiques et de leurs sources cellulaires (Zdravkovic et al., 2017). Beaucoup d'interleukines présentent des isoformes qui peuvent avoir des effets agonistes et/ou antagonistes par leur fixation sur le même récepteur. Les interleukines participent à la maturation, la migration et à l'adhésion cellulaire de même qu'à l'activation et la différenciation des cellules immunitaires. **Les tumor necrosis factors (TNF)** sont une famille composée de 19 ligands et 29 récepteurs. Tous les membres de cette famille présentent une activité pro-inflammatoire et ont des effets cytotoxiques sur les cellules tumorales. **Les interférons (IFN)** sont une famille de cytokines présentant une activité antivirale. En fonction du récepteur par lequel ils transmettent leurs signaux, les IFNs sont regroupés en trois groupes (Type I, II et III) (Zdravkovic et al., 2017). **Les facteurs de croissance** sont produits par différents types cellulaires pour stimuler la croissance et le développement tandis que **les facteurs de stimulation des colonies** (colony stimulating factors) sont impliqués dans la différenciation des lignées cellulaires du sang (Corwin, 2000). **Les chimiokines** (ou chemokines en anglais) sont des cytokines de faible poids moléculaire (8 à

12 kD) impliquées dans le chimiotactisme pour l'activation et la migration des leucocytes. Les chimiokines possèdent des résidus de cystéines conservées dans leur partie N-terminale qui permet de les classer en 4 familles (familles CXC, CC, C ou CX3C) (Abbas et al., n.d.). **Les adipokines** sont des protéines sécrétées par différentes cellules comme les adipocytes, les fibroblastes, les cellules immunitaires au niveau local dans le tissu adipeux. Ces cytokines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la régulation de l'appétit et de la satiété, la distribution des graisses, la régulation de la sécrétion d'insuline ou encore dans l'inflammation chronique. Ces dernières années, beaucoup de nouvelles adipokines ont été identifiées, leurs fonctions ne sont pas encore toutes élucidées (Fasshauer and Blüher, 2015).

b. Les cytokines pro et anti-inflammatoires :

Les cytokines participent à la prolifération cellulaire, à la régulation du métabolisme, au chimiotactisme, mais leur fonction première est la régulation de l'inflammation locale et systémique. L'analyse de leur activité biologique a permis d'identifier des cytokines qui présenteront un potentiel pro et/ou anti-inflammatoire. Pendant la réaction inflammatoire, les macrophages sont les principaux producteurs des cytokines pro-inflammatoires parmi lesquelles on retrouve l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, ou encore le TNF α . Le **TNF α** est un acteur majeur de la réponse immunitaire aiguë. Il est notamment impliqué dans la vasodilatation et dans la perte de perméabilité vasculaire favorisant le recrutement immunitaire. Son rôle inducteur de la réponse inflammatoire est également mis en cause dans des pathologies inflammatoires chroniques auto-immunes (Arango Duque and Descoteaux, 2014). **L'IL-1 β** est une des trois isoformes de l'IL-1 ayant des propriétés inflammatoires. Son précurseur est clivé par la caspase 1 de l'inflammasome puis libéré par autophagie pour stimuler la production par le foie de protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Arango Duque and Descoteaux, 2014). À l'inverse du TNF α et de l'IL-1 β , **l'IL-6** présente des propriétés pro et anti-inflammatoires qui dépendent des voies de synthèse utilisées (Arango Duque and Descoteaux, 2014). **L'IL-12** est impliquée dans la lutte contre les maladies infectieuses et cancéreuses. Elle est engagée dans la stimulation des lymphocytes Th1 et stimule la production d'IFN γ . Ainsi, lors d'une infection associée à des lésions tissulaires, les cytokines pro-inflammatoires participent à la communication entre les cellules immunitaires pour restaurer l'homéostasie. Elles peuvent également entrer dans la circulation sanguine pour participer à l'activation et au recrutement des cellules de l'immunité. Ces cytokines sont donc des acteurs clés de la réponse inflammatoire aiguë. Cependant, un excès de ces dernières participe à la genèse d'une inflammation chronique associée à de nombreuses pathologies.

Pour contrer les effets délétères des cytokines pro-inflammatoires, des cytokines anti-inflammatoires sont produites (Corwin, 2000; Liu et al., 2021). **L'IL-10** est connue comme la cytokine

anti-inflammatoire la plus importante. Par sa fixation à son récepteur hétéro-tétramérique (IL-10R) principalement présent sur les macrophages, les lymphocytes et les cellules dendritiques, l'IL-10 induit une transduction de signal par les voies JAK1/Tyk3 et STAT3 inhibant la voie des MAP kinases et de NFκB à l'origine de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, entraînant donc la diminution de leur synthèse. De plus, STAT3 favorise la production de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 qui entre en compétition avec l'IL-1β pour inhiber son action (Ouyang and O'Garra, 2019). **L'IL-4** peut également inhiber les cytokines dérivées des macrophages, mais elle est surtout impliquée dans la réponse des lymphocytes Th2. Elle possède le même récepteur que l'IL-13 et ces deux cytokines possèdent également des homologies de séquences. La différence majeure entre ces dernières est que l'IL-13 est produite par les lymphocytes T, mais n'a pas d'effet sur leur fonction (elle agit essentiellement sur les monocytes). **Le TGF-β** présente des propriétés immunorégulatrices sur la prolifération et la différenciation cellulaire de même que sur la formation de la matrice extracellulaire. Enfin **l'IL-6** est aujourd'hui considérée comme une cytokine pouvant présenter un potentiel anti-inflammatoire en jouant sur la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (TNFα et IL-1β) et anti-inflammatoires (IL-10 et TGFβ). Certaines de ces cytokines anti-inflammatoires sont utilisées comme traitement thérapeutique dans des maladies inflammatoires chroniques (Opal and DePalo, 2000).

Ainsi, la balance entre la sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires permet de mener à bien les réactions inflammatoires pour maintenir l'homéostasie. Mais l'effet d'une cytokine dépend de différents facteurs comme la cinétique de sa libération dans le milieu, du milieu dans lequel elle est synthétisée ou encore des éléments synergiques présents. C'est pourquoi il reste difficile de trancher sur les effets pro ou anti-inflammatoires de certaines cytokines.

II. L'interleukine 34

L'interleukine 34 (IL-34) a été découverte en 2008 et décrite comme présentant les capacités d'induire la prolifération et la différenciation des monocytes par sa fixation au récepteur du M-CSF (ou CSF-1), le CD115 (ou CSF1R) (Lin et al., 2008). Sa liaison similaire à celle du M-CSF sur le récepteur a été confirmée quelques années plus tard par la comparaison d'un modèle murin invalidé pour le M-CSF (Souris CSF1^{op}/CSF1^{op}) à des souris invalidées pour le récepteur CD115 (souris CSF1R⁻/CSF1R⁻). Les souris déficientes pour le M-CSF présentaient une réduction des macrophages tissulaires, une fertilité altérée, un développement neuronal retardé et ces souris étaient ostéopérotiques. Les souris invalidées pour le récepteur CD115 présentaient le même phénotype mais avec des conséquences plus sévères qui ne se dissipaient pas avec l'âge à l'inverse des souris déficientes pour le M-CSF suggérant donc une activation indépendante du facteur de croissance dû à un autre signal cytokinique (Dai et al., 2002).

Le gène de l'*IL34* est localisé sur le chromosome 16q22.1 chez l'Homme et 8E1 chez la souris. Cette cytokine de 39 kDa est conservée entre les espèces avec une homologie de 99,6% avec le chimpanzé, 72% avec le rat et 71% avec la souris. L'expression de son ARN est retrouvée dans de nombreux tissus ce qui suggère un rôle prépondérant de la cytokine dans le système de régulation des monocytes au niveau local (Lin et al., 2008). C'est une protéine hélicoïdale à chaîne courte N-glycosylée composée de 242 acides aminés sous sa forme mature (235 chez la souris) (Lin et al., 2008). Les 182 premiers acides aminés vont présenter des sites de N-glycosylation tandis que les derniers résidus composants la partie C-terminale forment des séquences flexibles de type mucine riches en sites de O glycosylation (Cf figure 7). Au niveau structurel, l'IL-34 se présente sous la forme de 4 hélices α antiparallèles avec deux hélices additionnelles. Les hélices sont connectées entre elles grâce à la présence de deux feuillets β . Afin de se lier au récepteur, la cytokine possède également des extensions terminales uniques (Baghdadi et al., 2018; Felix et al., 2013; Liu et al., 2012; X. Ma et al., 2012). (Cf figure 7)

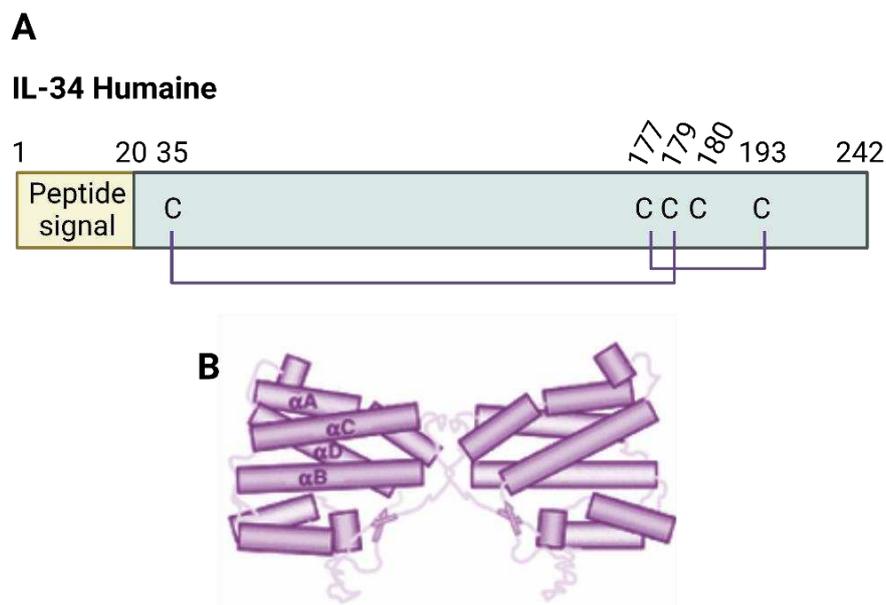


Figure 7 : Structure de l'Interleukine 34. (A) Structure primaire de l'IL-34. (B) Représentation en ruban de l'IL-34 dimérique. Adapté de (Nakamichi et al., 2013).

1. Les récepteurs de l'IL-34

a. CD115

Le récepteur CD115 premièrement décrit comme récepteur de l'IL-34 est un récepteur de type tyrosine kinase qui appartient à la famille des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (*Platelet-Derived Growth factor* ou PDGF). C'est le principal récepteur pour l'IL-34 et il est exprimé par les

cellules myéloïdes (Stanley and Chitu, 2014). Il a tout d'abord été identifié comme capable de lier le facteur de stimulation des colonies de macrophages (*Macophage colony-stimulating factor* ou M-CSF). Des analyses structurales sur la fixation respective des deux cytokines sur CD115 ont montré des liaisons de haute affinité, mais présentant quelques différences. Deux promoteurs de l'IL-34 vont former un dimère au niveau de l'extrémité la plus fine de leurs faisceaux hélicoïdaux pour se lier à deux copies du récepteur CD115. La liaison de l'IL-34 sur CD115 active un certain nombre de voies de signalisation telles que la voie STAT3, JAK, PI3/AKT, MAPK, NFκB, JNK et ERK 1/2 (Baud'Huin et al., 2010; Boulakirba et al., 2018; Chihara et al., 2010; Zhou et al., 2018) (Cf figure 8). L'analyse de la liaison IL-34/CD115 montre qu'elle est dépendante d'interactions hydrophobes au niveau des domaines immunoglobulines D2 et D3 du récepteur tandis que la liaison M-CSF/CD115 présente des interactions qui seront plutôt hydrophiles (Baghdadi et al., 2018; Liu et al., 2012; X. Ma et al., 2012). Ces interactions hydrophobes entraînent une dissociation plus lente de la cytokine et donc un contact plus fort favorisant un signal transmembranaire plus long (Baghdadi et al., 2018). Cependant, la liaison des deux cytokines induit une activité biologique similaire (Felix et al., 2013; X. Ma et al., 2012). Malgré cette activité biologique similaire, l'IL-34 est produite dans des régions où le M-CSF est peu présent suggérant des rôles propres de la cytokine pouvant être la conséquence de la fixation de l'IL-34 sur d'autres récepteurs.

b. PTPζ :

En lien avec l'expression de l'IL-34 dans le cerveau, une étude a cherché à identifier la présence d'un autre récepteur au niveau local. L'analyse de l'interaction de l'IL-34 avec des lysats membranaires de cerveau de souris de même qu'avec une lignée de cellules humaines de glioblastomes n'exprimant pas CD115 a permis d'identifier une fixation d'IL-34 sur le récepteur protéique de type tyrosine phosphatase zêta (*Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta* ou PTPζ) (Nandi et al., 2013). Ce récepteur membranaire est un protéoglycane de type sulfate de chondroïtine et sa liaison à l'IL-34 va être dépendante de la présence des chaînes de glycosaminoglycane (GAG). Cette interaction entraîne une augmentation de la phosphorylation des protéines en aval de PTPζ telles que FAK et paxilline ce qui suggère que l'IL-34 inhibe l'activité phosphatase du récepteur (Nandi et al., 2013) (Cf figure 8). Plus récemment, l'ARNm de PTPζ a été isolé dans le côlon de sujets sains et de patients atteints de maladie inflammatoire de l'intestin (MICI). Cette expression est corrélée à l'expression de l'IL-34, du M-CSF et de CD115 chez les patients atteints de MICI (Zwicker et al., 2016). De la même façon, une étude sur un modèle murin de lupus montre une expression de PTPζ par les cellules rénales intrinsèques augmentant avec la progression de la maladie et corrélée à une augmentation d'expression de CD115 (Baghdadi et al., 2018; Wada et al., 2019; R. Zhou et al., 2016).

c. SDC1 :

Récemment, le protéoglycane à base de sulfate d'héparane syndécan 1 (SDC1 ou CD138) a été identifié comme un corécepteur de CD115 capable de moduler l'activité de l'IL-34 (Segaliny et al., 2015, p. 1). SDC1 est un protéoglycane transmembranaire impliqué dans la viabilité des cellules, dans des processus d'angiogenèse et dans l'adhésion cellulaire (Teng et al., 2012). Tout comme son interaction avec PTP ζ , les chondroïtines sulfates de SDC1 vont réguler l'activité biologique de l'IL-34. Segaliny et coll ont montré un rôle modulateur de SDC1 sur la signalisation de l'IL-34 par CD115 dans une lignée monocyttaire. Ainsi, un niveau faible de SDC1 est associé à une séquestration de l'IL-34 au niveau membranaire ce qui limite son interaction avec CD115. A l'inverse, la surexpression de SDC1 est associée à une phosphorylation renforcée de CD115 induite par l'interaction avec l'IL-34. Le rôle de l'IL-34 sur la migration des cellules monocyttaire THP-1 et des macrophages différenciés M2 est dépendante de SDC1 qui une fois inhibé bloque ce processus (Segaliny et al., 2015, p. 1). Néanmoins, l'objectivation que ces phénomènes se produisent in vivo n'est pour le moment pas faite. (Cf figure 8)

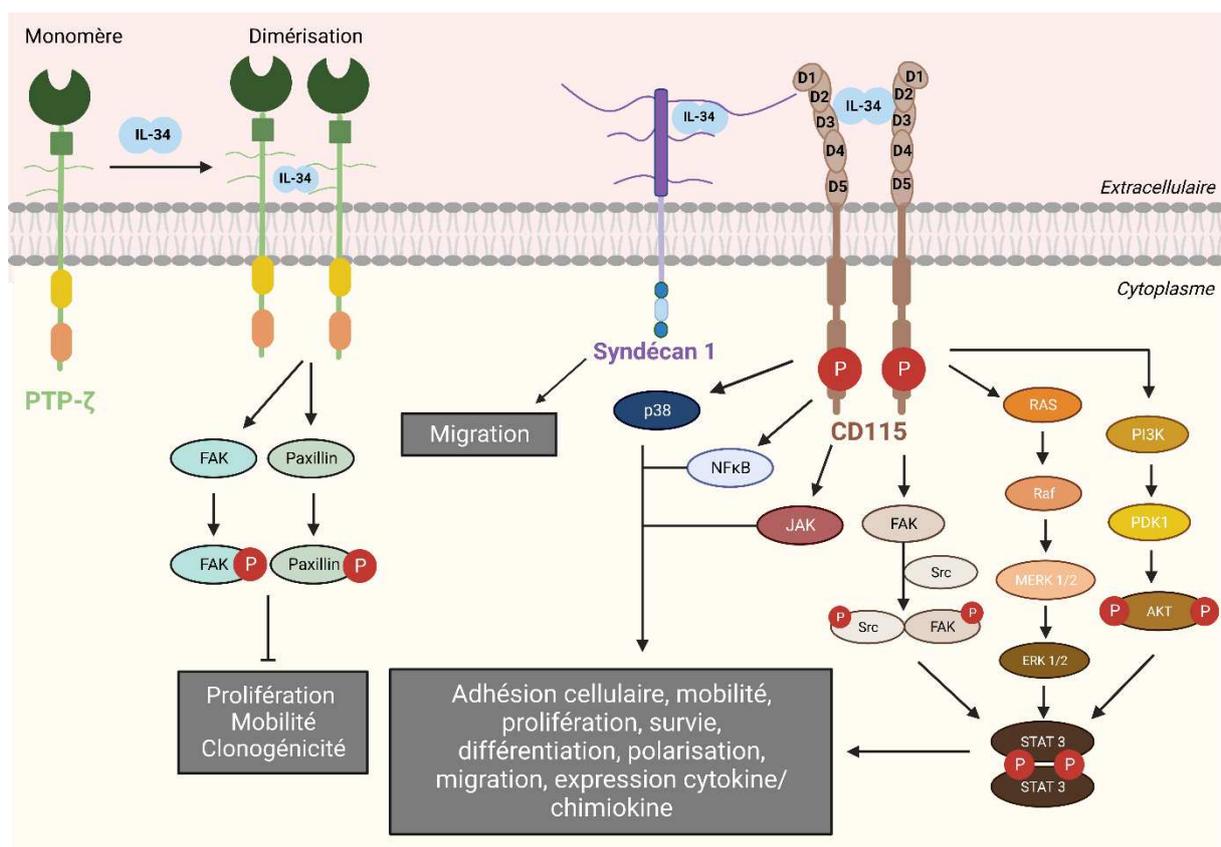


Figure 8 : Les voies de signalisations induites par l'IL-34. L'IL-34 sécrétée se lie au domaine extracellulaire de PTP ζ et CD115 ainsi qu'aux chaînes de chondroïtine sulfate de syndécan 1 entraînant l'activation de différentes voies de signalisations qui régulent des fonctions cellulaires majeures telles que la prolifération, la survie, le métabolisme, l'expression de cytokines/chimiokines de même que

l'adhésion cellulaire et la migration. *Adapté de (Baghdadi et al, JLB, 2018 ; Zhou et al, Immunology, 2016 ; Munoz-Garcia et al, Theranostics, 2021).*

2. Expression tissulaire de l'IL-34

L'IL-34 tout comme sa cytokine jumelle M-CSF est exprimée dans une grande variété de tissus en condition physiologique. L'expression la plus élevée en ARNm est retrouvée dans la peau et dans le cerveau où l'IL-34 est produite par les kératinocytes et les neurones respectivement (Wang et al., 2012). Le gène de *Il34* est en outre exprimé dans la rate, le cœur, les poumons, le foie, les reins et les testicules que ce soit chez l'homme ou la souris (Lin et al., 2008; Lelios et al., 2020; Masteller and Wong, 2014). Dans ces tissus, l'IL-34 sera produite par différents types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales ou les lymphocytes Tregs (Baghdadi et al., 2018; Lelios et al., 2020; Muñoz-Garcia et al., 2021). Les cellules exprimant l'ARNm du gène de *Il34* sont différentes des cellules exprimant l'ARNm du gène du M-CSF supportant l'idée que même si ces cytokines jumelles partagent le même récepteur, elles ont un rôle différent, entre autre décrit partiellement pour les populations tissulaires macrophagiques (Freuchet et al., 2021).

3. IL-34 et différenciation des macrophages

a. IL-34 et macrophages tissulaires

L'étude du modèle murin invalidé pour le gène de l'IL-34 (souris IL-34^{lacZ/lacZ}) a permis d'identifier les sources majeures d'IL-34 au niveau de l'organisme (Wang et al., 2012). En l'absence d'IL-34, la microglie et les cellules de Langerhans présentent des populations nettement diminuées chez la souris à l'âge adulte. Ces résultats ont également été montrés par des analyses histologiques chez l'humain (Greter et al., 2012). L'IL-34 associée au GM-CSF est capable d'induire la différenciation de monocytes sanguins en cellules microgliales à la différence du M-CSF confirmant le rôle essentiel de l'IL-34 dans le développement de la microglie (Ohgidani et al., 2014). Néanmoins, l'IL-34 n'est pas essentielle à l'influx de monocytes dans l'épiderme pendant l'inflammation. Cependant, sa présence est nécessaire pour leur maintenance dans le tissu (Greter et al., 2012; Y. Wang et al., 2016).

Au niveau osseux, l'IL-34 peut substituer le M-CSF dans la différenciation des ostéoclastes. L'identification de son expression dans des tumeurs osseuses humaines ainsi que l'observation du phénotype restauré au niveau osseux chez les souris CSF1^{op}/CSF1^{op} (invalidées pour le M-CSF) ont poussé à l'analyse de son rôle dans l'ostéoclastogenèse. L'IL-34 est donc capable de se substituer au M-CSF dans la différenciation des ostéoclastes induite par RANKL *in vitro* chez l'homme et la souris (Baud'Huin et al., 2010) (Cf figure 9). Une autre étude sur le modèle de souris CSF1^{op}/CSF1^{op} a montré

que la forte expression d'IL-34 dans la rate était impliquée dans le maintien des précurseurs d'ostéoclastes. Ces derniers sont ensuite libérés dans la circulation sous l'action du VEGF pour atteindre les os et se différencier en ostéoclastes. Ces observations appuient également le rôle redondant de l'IL-34 sur la différenciation des ostéoclastes et leur restauration chez les souris CSF1^{op}/CSF1^{op} en vieillissant (Nakamichi et al., 2012). Cette expression d'IL-34 chez les souris CSF1^{op}/CSF1^{op} est favorisée au niveau de la rate et des os par l'analogue de la vitamine D, un régulateur de l'homéostasie calcique (Nakamichi et al., 2012). Dans un contexte pathologique de parodontite, l'IL-1 β et le TNF α stimulent la production d'IL-34 par les fibroblastes gingivaux favorisant l'inflammation locale par l'activation de l'ostéoclastogenèse (Boström and Lundberg, 2013). Le TNF α est également capable d'induire l'expression de l'IL-34 en activant la voie NF κ B dans une lignée murine de cellules ostéoblastiques (YU et al., 2014). Malgré son rôle majeur dans le développement et la maintenance de la microglie et des cellules de Langerhans, l'IL-34 joue un rôle non redondant dans le remodelage osseux.

b. IL-34 et polarisation macrophagique

Les monocytes humains cultivés en présence d'IL-34 ou de M-CSF présentent un profil similaire de macrophages immunorégulateurs M2 associés à une forte production d'IL-10 et une production diminuée d'IL-12 (Foucher et al., 2013) (Cf figure 9). Le GM-CSF et l'IFN γ ont la capacité de contrer les effets de l'IL-34 sur la génération de macrophages immunosuppresseurs (Foucher et al., 2013). Des études complémentaires ont cherché à identifier des différences dans le sécrétome ou le profil transcriptionnel des macrophages différenciés en présence d'IL-34 ou de M-CSF. Les résultats confirment une capacité de polarisation en macrophages immunorégulateurs similaire entre le M-CSF et l'IL-34 (Barve et al., 2013; Boulakirba et al., 2018). Les propriétés immunorégulatrices de l'IL-34 par l'intermédiaire de la polarisation des macrophages sont retrouvées notamment dans la tolérance immunitaire placentaire chez les femmes enceintes (Lindau et al., 2018). Une étude sur des lignées leucémiques exprimant le récepteur CD115 a montré que l'IL-34 était également capable d'induire la différenciation de ces cellules vers un profil de cellules myéloïdes par l'expression de marqueurs spécifiques (CD14, CD68) et par l'apparition de fonctions biologiques telle que l'endocytose (Booker et al., 2015).

c. Rôle de l'IL-34 sur les TAMs

Les macrophages associés aux tumeurs (*Tumor Associated Macrophages* ou TAM) sont impliqués dans l'immunosuppression retrouvée au niveau du microenvironnement des tumeurs (Mantovani et al., 2022). L'IL-34 de par son rôle dans la polarisation des macrophages M2 a été identifiée comme

jouant un rôle sur le recrutement et la polarisation des TAMs (Cf figure 9). L'IL-34 est produite par un grand nombre de cellules tumorales : cellules de l'ostéosarcome, cellules cancéreuses pulmonaires, cellules du cancer colorectal, cellules cancéreuses du sein, de l'ovaire ou encore du colon (Franzè et al., 2020b). Segaliny et al ont montré que les cytokines pro-inflammatoires favorisent la production d'IL-34 par les cellules d'ostéosarcome. Une fois sécrétée, la cytokine contribue à la formation de néo-vaisseaux et induit le recrutement et la différenciation de macrophages présentant un profil M2 (Ségaly et al., 2015). De la même façon, l'étude de l'implication de microARN (miRNA) dans l'hépatocarcinome a identifié le gène de *Il134* comme cible privilégiée de miR-28-5p. La répression de miR-28-5p dans les cellules tumorales induit une surexpression de l'IL-34 qui va favoriser l'infiltration des TAMs. A leur tour, les TAMs recrutés agissent comme un rétrocontrôle sur la progression de l'hépatocarcinome (S.-L. Zhou et al., 2016). Dans le contexte de tumeur pulmonaire, les TAMs recrutés par l'IL-34 produite en amont par les cellules chimiorésistantes favorisent leur survie et la progression tumorale (Baghdadi et al., 2016). De la même façon que pour les TAMs, l'augmentation d'expression de l'IL-34 est associée à un mauvais pronostic comme chez les patients atteints d'un cancer colorectal (Kajihara et al., 2020). Ce rôle de l'IL-34 a également été observé dans le cancer du sein (Kajihara et al., 2020; Poudel et al., 2021), de l'ovaire (Endo et al., 2020) ou du colon (Franzè et al., 2018). Dans un contexte cancéreux, l'IL-34 apparaît comme une cytokine pro-tumorale qui accroît les fonctions immunosuppressives des TAMs.

d. IL-34 et cellules T

Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires sont des cellules plastiques qui adaptent leur phénotype selon l'environnement local. Foucher et coll. ont cherché à évaluer la capacité des macrophages différenciés en présence de M-CSF ou d'IL-34, ainsi que des TAM isolés du cancer de l'ovaire à moduler la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ mémoires humains. La coculture de ces lymphocytes avec des macrophages différenciés en présence de M-CSF ou d'IL-34 (M-CSF-Mφ et IL-34-Mφ) ou des TAMs induit la polarisation de lymphocytes T en lymphocytes Th17 (Cf figure 9). Ces lymphocytes Th17 présentent un phénotype conventionnel pro-inflammatoire. Cette polarisation est induite par l'expression membranaire de l'IL-1α par les M-CSF-Mφ, les IL-34-Mφ et les TAMs (Foucher et al., 2015). Bézie et coll. ont quant à eux montré que l'IL-34 que ce soit chez la souris ou chez l'homme est une cytokine spécifique des lymphocytes T régulateurs (Treg) qui *in vitro* favorise leur expansion en présence de macrophages (Bézie et al., 2020, 2015) (Cf figure 9). En outre, l'injection de Treg CD4⁺ issus de souris déficientes en IL-34 (IL-34^{-/-}) dans différents modèles d'auto-immunité ou de tolérance n'est pas protectrice comparativement aux Tregs CD4⁺ issus de souris sauvages montrant donc le rôle

important de l'IL-34 sur les fonctions immunorégulatrices des lymphocytes T régulateurs (Freuchet et al., 2022).

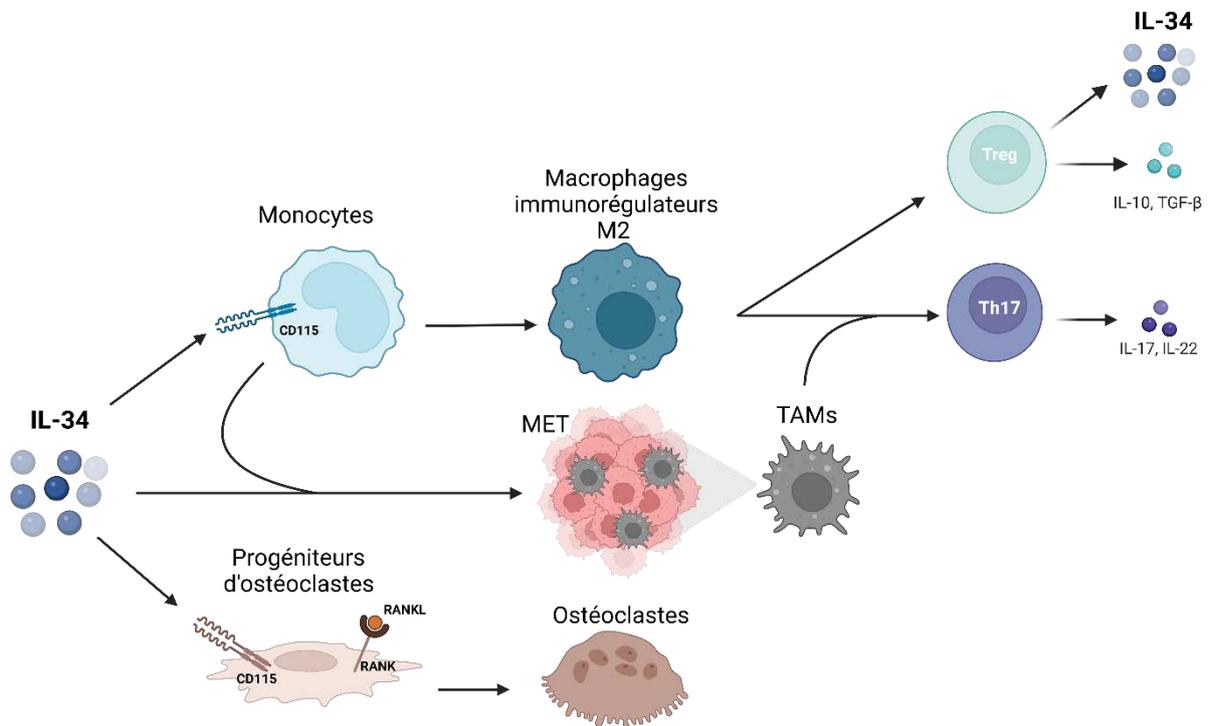


Figure 9 : Rôle direct et indirect de l'IL-34 au niveau cellulaire. L'IL-34 se lie à son récepteur CD115 pour induire la différenciation des monocytes en macrophages immunorégulateurs. Dans le microenvironnement tumoral (MET), ce rôle participe à l'accumulation des macrophages associés aux tumeurs (TAMs). Les macrophages de type M2 et les TAMs différenciés sous IL-34 participent à la différenciation des lymphocytes T de type Th17. Les macrophages M2 peuvent également induire la polarisation des lymphocytes T de type Treg qui eux-mêmes produisent de l'IL-34. Parallèlement, l'IL-34 peut favoriser la différenciation des ostéoclastes.

4. L'IL-34 en conditions pathologiques

a. L'IL-34 et maladies neurologiques

En raison de la production localisée d'IL-34 dans le cerveau, des recherches ont été menées afin d'évaluer le rôle de cette cytokine sur les fonctions de la microglie dans différents contextes de maladies neurologiques. Le peptide amyloïde oligomérique ($\text{oA}\beta$) a des propriétés toxiques directes dans la maladie d'Alzheimer notamment par la production neuronale d'espèces réactive de l'oxygène (*Reactive oxygen species* ou ROS). En présence d'IL-34, *in vitro* la microglie favorise l'élimination des dépôts d' $\text{oA}\beta$ par l'expression de l'enzyme antioxydante HO-1 (*heme oxygenase 1*) qui diminue le stress oxydatif. De la même façon, dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer, le traitement par l'IL-34

favorise l'activité des enzymes IDE (*Insulin-degrading enzyme*) et HO-1 et reproduit les effets bénéfiques observés *in vitro* (Mizuno et al., 2011). L'IL-34 entraîne également la production de TGF- β par la microglie qui participe à la baisse de la neurotoxicité d'oA β *in vitro* (D. Ma et al., 2012). Les effets immunorégulateurs de l'IL-34 au niveau cérébral ont aussi été mis en évidence dans une étude sur la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'ajout d'IL-34 sur une lignée murine de cellules endothéliales capillaires cérébrales augmente l'expression des protéines des jonctions serrées telles la claudine 5 et l'occludine qui sont sous exprimées en présence de cytokines pro-inflammatoires dans un contexte de désordre neuronal (Jin et al., 2014).

D'autre part, l'agrégation de la protéine huntingtine mutée favorise l'expression d'IL-34 par les neurones en développement issus de cellules souches embryonnaires humaines *in vitro*. Cette protéine mutée (mHTTx1) est notamment utilisée dans des modèles murins de la maladie de Huntington. Khoshnan et al ont montré que la production d'IL-34 par les neurones en développement est induite par des agents de stress neuronal tels que l'étoposide qui induit des dommages à l'ADN en interagissant avec la topoisomérase II, la staurosporine qui est un inhibiteur de protéines kinases à large spectre ou la protéine mHTTx1. Également, le blocage de l'activité de la kinase IKK β (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase sub-unit β*) prévient les agrégats de la protéine huntingtine mutée et ainsi la production d'IL-34. *In vivo*, cette production d'IL-34 favorise la dégénération induite par la protéine mHTTx1 suggérant que la cytokine est néfaste dans ce contexte de maladie neurodégénérative dépendante de l'expansion microgliale (Khoshnan et al., 2017). (Cf figure 10)

b. L'IL-34 dans les maladies infectieuses

L'augmentation d'expression de l'IL-34 dans un contexte infectieux a été observée pour la première fois en 2010 par Covalada et al. dans la pathologie équine de l'anémie infectieuse provoquée par le virus de l'anémie infectieuse équine (EIVA). Les macrophages dérivés des monocytes équins présentent une surexpression de l'IL-34 suite à l'infection par le EIVA (Covalada et al., 2010). De la même façon, dans une étude cherchant à différencier le profil phénotypique des macrophages différenciés en présence d'IL-34 ou de M-CSF, l'IL-34 a été identifiée comme une cytokine favorisant la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans les macrophages par une activation plus forte des voies de signalisation en aval de sa fixation sur CD115 (Chihara et al., 2010). *In vitro*, une étude a également montré que l'IL-34 favorise la réplication du VIH dans la microglie par l'intermédiaire de sa fixation sur le récepteur CD115 (Gerngross and Fischer, 2015). Le VIH peut être responsable d'anomalies cognitives appelées désordres neurocognitifs associés au VIH (HAND) où la microglie et les macrophages périphériques participent à la progression de la maladie. En lien avec ces symptômes, dans un modèle de primate infecté par le virus de l'immunodéficience simienne (SIV), l'IL-

34 a été identifiée dans le parenchyme cérébral corroborant les effets de l'IL-34 sur la microglie dans un contexte d'infection par le VIH (Gerngross et al., 2015).

L'IL-34 a également été identifiée comme produite en excès par les hépatocytes de patients infectés par le virus de l'hépatite C (*Hepatitis C virus* ou HCV) contribuant à la polarisation des macrophages pro-fibrotiques (Preisser et al., 2014). L'augmentation d'IL-34 peut être de la même façon induite par l'IL-22 lors d'une infection par le virus de la grippe A (*Influenza A virus* IAV). En rétrocontrôle l'IL-34 atténue la production d'IL-22 impliquée dans la réponse immunitaire antivirale (Yu et al., 2015).

D'autre part, l'IL-34 a été rapportée comme pouvant être bénéfique dans certaines maladies infectieuses. Par exemple, chez des patients infectés par le virus de l'hépatite B (*Hepatitis B virus* ou HBV), l'IL-34 est retrouvée diminuée de façon significative dans le sérum ainsi que dans les PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells*) isolés. Cette diminution est inversement corrélée avec la quantité d'ADN viral et avec les marqueurs de lésions hépatiques. En outre, le traitement exogène par de l'IL-34 dans un modèle de souris et *in vitro* inhibe la réplication du virus suggérant un effet protecteur de la cytokine (Cheng et al., 2017). Dans un modèle d'infection par FV3 (*frog virus 3*) chez les amphibiens (*Xenopus laevis*), Grayfer et Robert ont montré que l'injection d'IL-34 comparativement au M-CSF favorise la survie des animaux. Les macrophages des amphibiens différenciés en présence d'IL-34 ont une activité antivirale plus importante que les M ϕ -M-CSF. Cette activité antivirale est caractérisée par une expression plus forte du gène de *l'IFN de type 1* et par une production de ROS (Grayfer and Robert, 2015, 2014).

L'IL-34 a également été retrouvée augmentée dans les kératinocytes lors d'une infection fongique par *Candida Albicans*. La cytokine inhibe la production de TNF α par les macrophages de type M1 après stimulation par *Candida*. Cette inhibition est associée à une diminution d'expression de TLR2 et Dectine 1 par les macrophages de type M1 suggérant que l'IL-34 produite de façon constitutive par les kératinocytes de la peau régule l'inflammation induite par la colonisation de *Candida* (Xu et al., 2015). De plus, le rôle protecteur de l'IL-34 a été mentionné dans un contexte de sepsis où le taux sérique de la cytokine est augmenté chez les patients septiques de même que chez les souris après induction du sepsis par ponction et ligature caecale (*Cecal ligation and puncture* ou CLP). Dans ce modèle, l'administration d'IL-34 améliore la survie des souris. À l'inverse, après l'induction du sepsis, l'injection d'un anticorps (Ac) neutralisant l'IL-34 diminue significativement la survie des souris suggérant un rôle prépondérant de la cytokine (Lin et al., 2018).

L'action bénéfique ou néfaste de l'IL-34 semble donc être dépendante du pathogène et de l'implication des macrophages, cibles privilégiés de la cytokine.

c. L'IL-34 et la tolérance

L'enjeu majeur d'une transplantation d'organe est d'éviter le rejet de greffe par le receveur. Ce rejet est médié par le système immunitaire qui reconnaît les antigènes (Ag) du donneur comme molécule étrangère et qui induit donc une réaction immunitaire détruisant le greffon notamment par l'activation des lymphocytes T effecteurs. Pour lutter contre ce phénomène, l'utilisation d'immunosuppresseurs est nécessaire chez les patients greffés. La différenciation des lymphocytes T régulateurs (Treg) a été identifiée comme bénéfique dans la médiation de la tolérance. Dans ce contexte, l'IL-34 a été identifiée comme étant produite par les lymphocytes Treg activés chez l'homme (CD4⁺ et CD8⁺ FOXP3⁺CD45RC^{lo}) et le rat (CD8⁺CD45RC^{lo}) (Cf figure 9). Bézie et coll. ont montré dans un modèle d'allogreffe chez le rat que le traitement par des injections d'IL-34 associé à un immunosuppresseur favorise la tolérance par l'activation des Treg FOXP3⁺ CD4⁺ et CD8⁺ qui modulent notamment la différenciation et l'activité des monocytes recrutés (Bézie et al., 2015). Dans un modèle de maladie du greffon contre l'hôte (*Graft-versus-host disease* ou GVHD) induit par l'injection de PBMCs humains chez des souris humanisées immunodéficientes (*NOD scid gamma mice* ou NSG), le traitement combiné d'IL-34 et d'un Ac déplétant les lymphocytes T conventionnels diminue la mortalité des souris traitées de 66% (Bézie et al., 2020). L'injection des Tregs FOXP3⁺ CD8⁺ humains différenciés en présence des Mφ-IL-34 retarde également la perte de poids et la mort des souris (Bézie et al., 2020). Chez les souris invalidées pour le gène de *Il34* (IL-34^{-/-}), l'injection d'IL-34 associée à un immunosuppresseur retarde l'auto-immunité observée chez les souris IL-34^{-/-} contrôles (présence d'autoanticorps) (Freuchet et al., 2022). Enfin, dans un contexte de greffe rénale, les patients avec des taux élevés d'IL-34 dans le sérum avant l'intervention présentaient un temps sans rejet du greffon plus long (Freuchet et al., 2022). L'IL-34 est une cytokine impliquée dans la tolérance immunitaire.

d. L'IL-34 dans les maladies auto-immunes

La première pathologie auto-immune pour laquelle l'IL-34 a été décrite comme jouant un rôle néfaste est l'arthrite rhumatoïde (*Rhumatoid arthritis* ou RA). Cette maladie auto-immune se caractérise par une inflammation du tissu synovial entraînant une destruction du cartilage et des os (Chemel et al., 2012). Les dosages sériques chez les patients atteints de RA ont montré une élévation significative d'IL-34 comparativement aux sujets sains (Chang et al., 2015 ; Chemel et al., 2012; Moon et al., 2013; Tian et al., 2013; Wang et al., 2017). La production d'IL-34 est corrélée positivement à l'augmentation des facteurs inflammatoires et à la progression de la maladie (Chang et al., 2015; Tian et al., 2013). Cette surexpression de la cytokine est induite par les fibroblastes synoviaux après stimulation par les cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL-1β (Chemel et al., 2012; Wang et al., 2017). Une fois produite, l'IL-34 entraîne à son tour la production d'IL-6, une cytokine impliquée dans la

génération de lymphocytes Th17, par les fibroblastes synoviaux et par les monocytes de patients atteints de RA, vecteurs de la destruction du cartilage (Wang et al., 2018, 2017). L'élévation d'IL-34 est également retrouvée localement dans la maladie de Gougerot-Sjögren. Cette maladie auto-immune est associée à une forte production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules épithéliales au niveau des glandes salivaires induisant un fort recrutement de lymphocytes. Wang et coll. ont identifié une production d'IL-34 par les cellules épithéliales des glandes salivaires associée à une surexpression d'IL-1 β , de TNF α et d'IL-17. L'IL-34 jouerait un rôle direct dans la différenciation de monocytes pro-inflammatoires induisant la polarisation des lymphocytes Th17 (Ciccia et al., 2013). De la même façon, la recherche de biomarqueurs dans le lupus érythémateux systémique (LES) a identifié une augmentation sérique d'IL-34 chez les patients atteints qui corrèle avec l'index d'activité de la maladie (SLEDAI) (Wang et al., 2016 ; Xie et al., 2018). (Cf figure 10)

e. L'IL-34 dans les maladies inflammatoires chroniques

De nombreuses études cliniques ont mis en évidence une augmentation de l'IL-34 circulante en conditions pathologiques inflammatoires et ont cherché à identifier si cette augmentation de production était bénéfique ou néfaste et quel rôle jouait l'IL-34 dans ce contexte.

i. Maladies inflammatoires de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comprennent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RHC) et sont caractérisées par l'inflammation d'une partie du tube digestif, due à une dérégulation du système immunitaire (Franzè et al., 2015). Les cellules mononucléaires de la lamina propria (*Lamina propria mononuclear cell* ou LPMC) issues du colon de patients atteints de MICI présentent une surexpression d'IL-34 comparativement à des sujets sains. Cette production d'IL-34 est induite par le TNF α ainsi que par l'activation de différents TLRs par leurs ligands tels que les motifs CpG, le peptidoglycane (PGN) et favorise par conséquent la synthèse d'IL-6 et de TNF α par les LPMCs. Franzè et *al.* ont également montré que la neutralisation de l'IL-34 diminuait la production de la chimiokine CCL20 par les cellules issues de biopsies de patients atteints de MICI (Franzè et al., 2016). Les patients en stades tardifs de MICI présentent un développement de fibrose au niveau intestinal. Il a récemment été montré que l'IL-34 agit comme un facteur pro-fibrotique favorisant la production de facteurs de collagène par les fibroblastes intestinaux (Franzè et al., 2020a). L'IL-34 semble agir comme un facteur pro-inflammatoire et pro-fibrotique dans les MICI (Cf figure 10).

ii. Inflammation rénale

Dans un modèle murin d'ischémie reperfusion (I/R), une surexpression d'IL-34 a été identifiée par les cellules épithéliales tubulaires rénales (*Tubular epithelial cell* ou TEC). Ce modèle entraîne des lésions rénales aiguës puis des maladies rénales chroniques par la suite. Une expression séquentielle des deux récepteurs CD115 et PTP- ζ est observée après l'induction de l'I/R par ces cellules rénales. L'expression de PTP ζ et sa liaison à l'IL-34 est observée uniquement au stade chronique de la maladie suggérant un rétrocontrôle de la cytokine au niveau local. La mise en place du modèle I/R chez des souris IL-34^{-/-} a mis en évidence le rôle de l'IL-34 dans l'inflammation rénale. L'IL-34 favorise l'accumulation des macrophages localement et la prolifération des cellules myéloïdes à partir de la moelle osseuse par l'intermédiaire de chimiokines produites au niveau des reins telles que CCL2. De façon intéressante, le M-CSF ne compense pas l'absence d'IL-34 chez les souris après l'I/R suggérant un rôle non redondant de l'IL-34 dans l'inflammation chronique rénale (Baek et al., 2015). (Cf figure 10)

iii. Fibrose hépatique

Le développement d'une fibrose hépatique fait suite à des lésions hépatocellulaires d'origines diverses : infectieuses, médicamenteuses ou encore suite à des maladies congénitales. La fibrose hépatique se traduit par l'accumulation de tissus conjonctifs suite à une cicatrisation excessive conduisant à une activation et une transformation des cellules stellaires hépatiques en myofibroblastes qui à leur tour sécrètent des composantes de la MEC (Krenkel and Tacke, 2017). Les macrophages tissulaires au profil immunorégulateur jouent un rôle prépondérant dans la fibrogenèse hépatique. Au laboratoire, dans une étude sur la fibrose hépatique induite par le virus de l'hépatite C, Preisser et *al.* ont identifié une production locale d'IL-34 et de M-CSF par les hépatocytes chez les patients, responsable de l'élévation sérique des deux cytokines. Au niveau local, l'IL-34 et le M-CSF induisent la différenciation des macrophages pro-fibrotiques producteurs de facteurs tels que le PDGF, la galectine 3 et le TGF- β 1 responsables de la différenciation des cellules hépatiques stellaires productrices du collagène. La production d'IFN γ par les NK initialement impliqués dans la destruction des myofibroblastes est également inhibée par ces macrophages pro-fibrotiques. L'IL-34 au même titre que le M-CSF est identifiée comme des facteurs pro-fibrotiques chez les patients infectés par le virus HCV (Preisser et al., 2014). Plus récemment, une autre étude a identifié une production d'IL-34 par les fibroblastes hépatiques de patients souffrant d'une stéatose hépatique non alcoolique (*Non-alcoholic steatohepatitis* ou NASH). Les dosages sériques de l'IL-34 montrent une corrélation des taux de la cytokine au développement de la fibrose. Et, leur analyse de score pour l'identification de nouveaux biomarqueurs pour la fibrose identifient l'IL-34 comme le marqueur le plus prédictif de l'évolution de

la NASH comparativement au M-CSF ou encore au marqueur macrophagique soluble CD163 (Shoji et al., 2016). (Cf figure 10)

iv. Endométriose

L'endométriose est une maladie gynécologique inflammatoire et chronique responsable de l'invasion d'organes par des cellules de l'endomètre en dehors de l'utérus. Différents organes peuvent être touchés engendrant des dysfonctionnements et pouvant entraîner une infertilité. Les facteurs inflammatoires tels que l'IL-17 participent à la pathogénèse en augmentant l'angiogenèse et la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires. Des analyses sur l'expression d'IL-34 sur des échantillons de patientes atteintes d'endométriose ont identifié une augmentation de cette dernière. En complément, les cellules stromales endométriales (*Endometrial stromal cell* ou ESC) mises en culture en présence d'IL-34 croissent de façon dose-dépendante et surexpriment des facteurs tels que le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), ou les métalloprotéases MMP2 et MMP3. Cette production autocrine d'IL-34 est favorisée par la fixation de STAT sur son promoteur et induit l'expansion des cellules stromales par la fixation de la cytokine sur CD115. L'IL-34 joue donc un rôle prépondérant dans la prolifération et la migration des ESC dans l'endométriose (Lin et al., 2019). Plus récemment, une corrélation entre l'augmentation d'IL-34 et du récepteur à la chimiokine CX3 (CX3CR1) dans l'endomètre a été mise en évidence. *In vitro*, la différenciation des BMDMs (*Bone marrow-derived macrophage*) murins en présence d'IL-34 favorise un profil de macrophages exprimant fortement CX3CR1. Ces derniers favorisent la différenciation des myofibroblastes impliqués dans la fibrose endométriale (Wang et al., 2021). L'IL-34 agit donc de façon directe sur les ESC, mais participe également à la différenciation des monocytes en macrophages pro-fibrotiques. (Cf figure 10)

v. Maladies métaboliques

Les macrophages du tissu adipeux sont des médiateurs importants de l'inflammation dans le tissu adipeux en situation d'obésité (leur rôle sera détaillé dans le chapitre 3). En raison du rôle de l'IL-34 sur la polarisation des macrophages, Chang et coll. ont recherché un rôle potentiel de l'IL-34 dans l'inflammation chronique chez des patientes obèses. L'augmentation sérique chez les patientes en situation d'obésité corrèle positivement avec différents marqueurs métaboliques tels que l'insulinémie à jeun, le niveau de leptine et la proportion du tissu adipeux blanc. Les adipocytes sont directement responsables de la production d'IL-34 qui est accrue en présence de cytokines pro-inflammatoires ou de macrophages. Les adipocytes cultivés en présence de forte quantité d'IL-34 n'absorbent plus le 2 déoxyglucose stimulé par l'insuline. L'IL-34, surexprimée en conditions d'obésité

jouerait donc un rôle sur la régulation de l'insuline dans le métabolisme lipidique indépendamment de son rôle sur les macrophages (Chang et al., 2014).

L'obésité est un des facteurs de risque majeur pour le développement d'une résistance à l'insuline et d'un diabète de type 2 (DT2). Plusieurs analyses bio-informatiques ont cherché à identifier des facteurs de risques pour le développement d'un DT2. Une étude sur une cohorte américaine de patientes atteintes de DT2 a identifié des polymorphismes nucléotidiques (SNP) dans 8 régions géniques parmi lesquelles figurait le gène de *IL34* (Below et al., 2011). De la même façon, dans une étude réalisée sur la population chinoise, quatre SNP sur le gène de *IL34* ont été identifiés comme entraînant deux fois plus de risques de développer une néphropathie chez les patients atteints de DT2 (Liao et al., 2014). Zorena et al. ont déterminé une valeur seuil pour les niveaux d'IL-34 comme une prédiction associée aux complications dans le DT2 (Zorena et al., 2016). Récemment, l'analyse du rôle de l'IL-34 dans le DT2 a mis en évidence son augmentation dans la circulation chez les patients DT2 corrélée à l'index de résistance à l'insuline (Mostafa et al., 2021). Une élévation sérique d'IL-34 est également observée dans une cohorte de femmes enceintes atteintes d'un diabète gestationnel associée à un taux de glucose élevé et une résistance à l'insuline (Piao et al., 2019). (Cf figure 10)

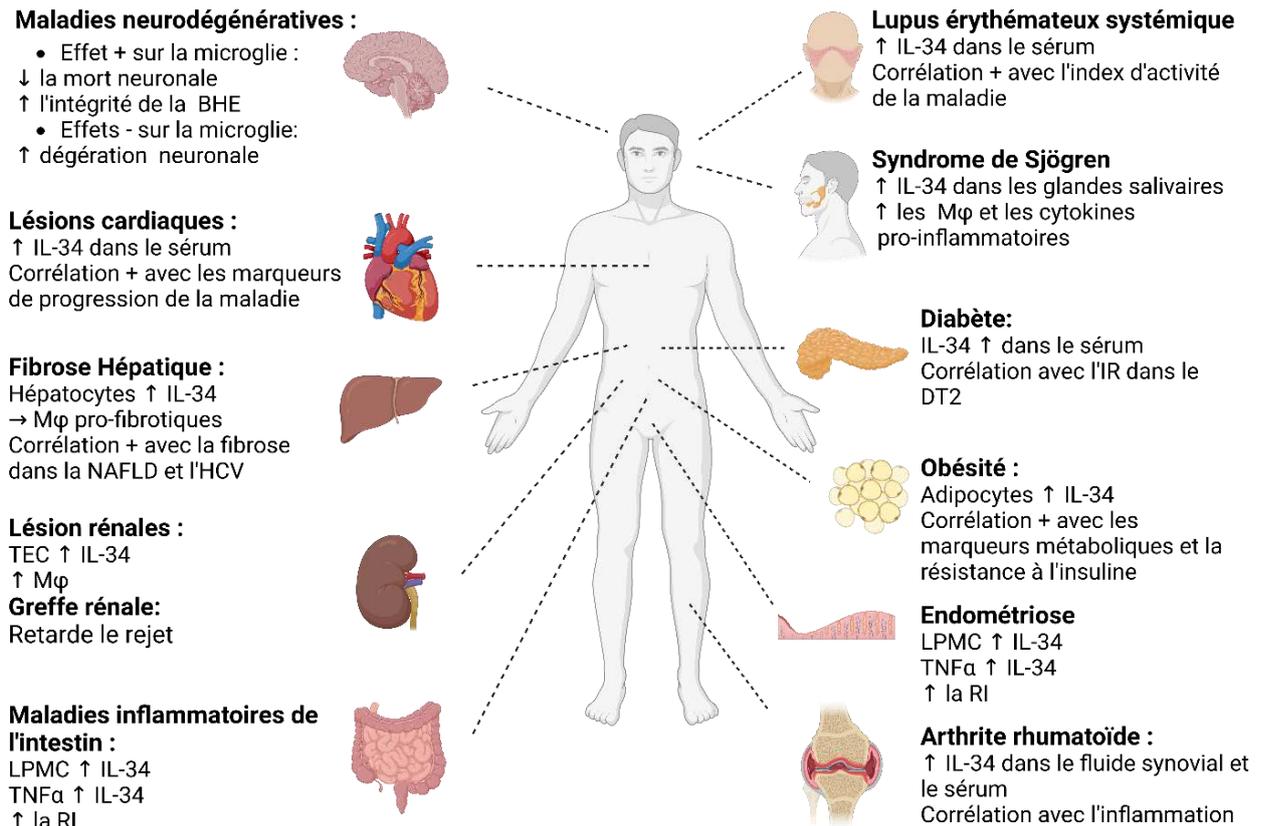


Figure 10 : Résumé des actions de l'IL-34 en conditions pathologiques. L'IL-34 est une cytokine induite dans différentes maladies inflammatoires telles que les maladies neurologiques, les lésions cardiaques, la fibrose hépatique, les lésions rénales, les maladies inflammatoires de l'intestin, le lupus érythémateux systémique, la maladie de Sjögren, le diabète, l'obésité, l'endométriose et l'arthrite rhumatoïde. Réponse inflammatoire (RI), barrière hémato-encéphalique (BHE), cellules épithéliales tubulaires (TEC), macrophages (Mφ), résistance à l'insuline (IR), les cellules mononucléaires de la lamina propria (LPMC), stéatose hépatique non alcoolique (NASH). *Adapté de (Baghdadi et al., 2017).*

III. Le pancréas et la régulation du glucose

1. Physiologie du pancréas

a. Morphologie du pancréas humain et murin

Le pancréas est un organe glandulaire issu de l'endoderme de l'intestin primitif et qui se situe sur la paroi abdominale postérieure, dans le plan rétropéritonéal. Chez l'homme, le pancréas a un volume moyen de 72 cm³ et peut être divisé en 4 zones morphologiquement distinctes qui sont la tête, le coup, le corps et la queue (Henry et al., 2019). Il est composé d'une partie exocrine structurée en lobules et composée des cellules acineuses qui sécrètent le fluide digestif qui est déversé dans l'intestin (Jennings et al., 2015). Ce fluide contient principalement de l'eau, des ions bicarbonate, et des enzymes telles que l'amylase, la lipase et la trypsine. La partie endocrine du pancréas correspond aux îlots de Langerhans.

Les îlots de Langerhans regroupent différents types cellulaires, chacun sécrétant des hormones impliquées dans la régulation de la glycémie (Jennings et al., 2015) : les cellules α sécrètent le glucagon, les cellules β sécrètent l'insuline, les cellules δ sécrètent la somatostatine, les cellules ϵ sécrètent la ghréline et les cellules γ le polypeptide pancréatique. Afin de pallier les difficultés à obtenir des échantillons de pancréas humains, la majorité des études reposent sur le modèle murin. Cependant, des différences morphologiques existent entre l'homme et la souris (Cf figure 11). Le pancréas murin, qui se présente sous forme diffuse au niveau du mésentère de l'intestin grêle, est composé de 3 lobes : le lobe duodéal, équivalent de la tête du pancréas chez l'homme, le lobe splénique, qui correspond au corps du pancréas humain, et le lobe gastrique qui s'apparente à la queue du pancréas humain. Ces différents lobes sont séparés par des tissus adipeux, conjonctifs et lymphatiques (Dolenšek et al., 2015).

La taille et la distribution des îlots de Langerhans sont similaires chez l'homme et la souris. Les cellules β sont majoritaires et représentent 50 à 70% des cellules totales de l'îlot chez l'homme et 60 à 80% chez la souris. Les cellules α comptent pour 20 à 40% et 10 à 20% des cellules des îlots, respectivement chez l'homme et la souris. Les cellules δ et γ regroupent 10% de la totalité des cellules et 1% pour les cellules ϵ (Dolenšek et al., 2015). Chez la souris, les cellules β sont rassemblées en un noyau entourées par les autres types cellulaires qui s'organisent en manteau. Chez l'homme, les cellules β forment, dans les îlots, des grappes organisées autour des autres types cellulaires. Cependant, que ce soit chez l'homme ou la souris, l'architecture des îlots est hétérogène en fonction de leurs tailles ; plus l'îlot est grand et plus l'architecture sera complexe (Dolenšek et al., 2015). (Cf figure 11)

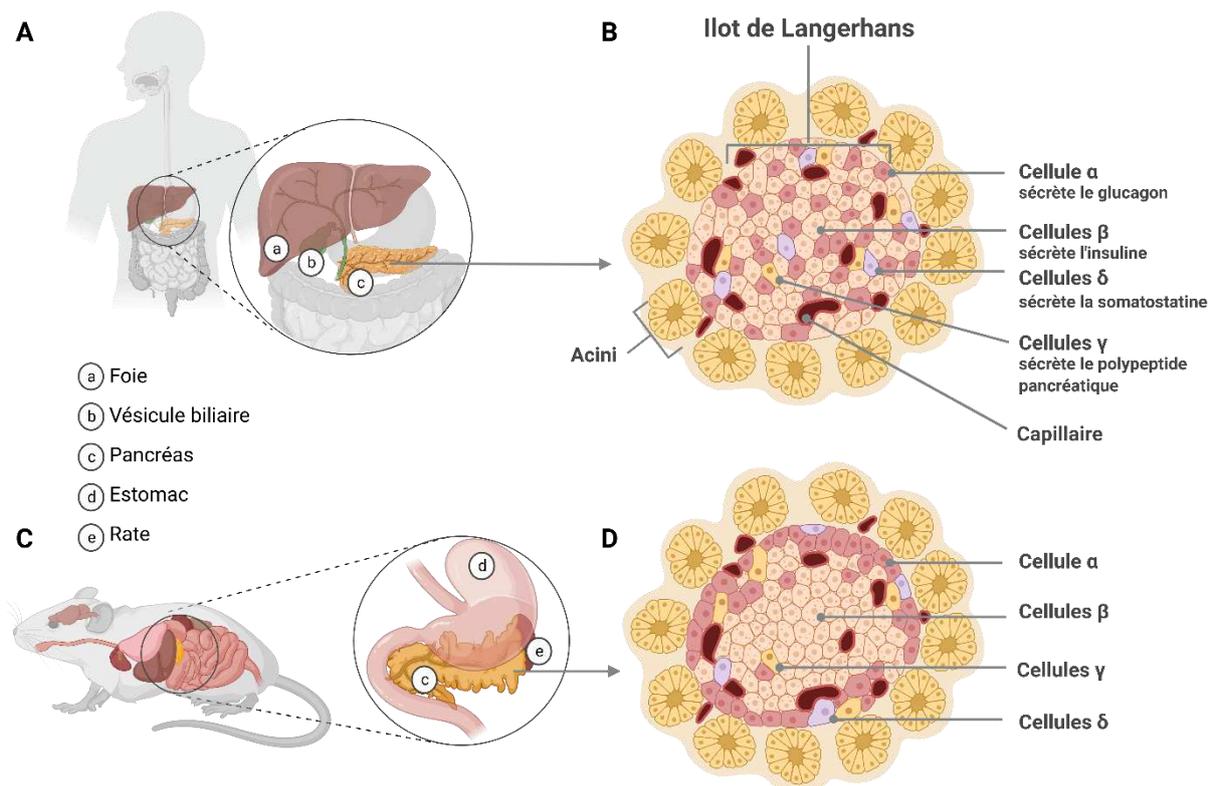


Figure 11 : Anatomie du pancréas humain et murin. (A) Le pancréas humain et les organes voisins. **(C)** Le pancréas murin et les organes voisins. Vue microscopique des îlots de Langerhans humains **(B)** et murins **(D)**.

b. Régulation de l'homéostasie du glucose par le pancréas endocrine

Le principal rôle du pancréas endocrine est la régulation du taux de glucose sanguin qui doit être maintenu entre 4 et 6 mM. Cette régulation repose sur un équilibre entre la sécrétion d'insuline par les cellules β et celle de glucagon par les cellules α des îlots de Langerhans (Cf figure 12). Pendant le sommeil ou en période de jeûne, le glucagon induit la glycogénolyse (transformation du glycogène en glucose) et la néoglucogenèse (production de glucose à partir de substrats non-glucidiques tels que le pyruvate, le lactate ou le glycérol) dans le foie afin d'augmenter le taux de glucose sanguin. À l'inverse, suite à un important apport de glucose comme après les repas, les cellules β sécrètent l'insuline qui favorise l'absorption du glucose exogène par les tissus cibles comme les muscles ou le tissu adipeux, afin de maintenir des concentrations physiologiques de glucose dans l'organisme (Röder et al., 2016). Cet équilibre sécrétoire, qui permet de contrôler les stades d'hypo- et d'hyperglycémie, repose notamment sur la proportion élevée des cellules β productrices d'insuline, témoignant de l'importance métabolique de cette hormone.

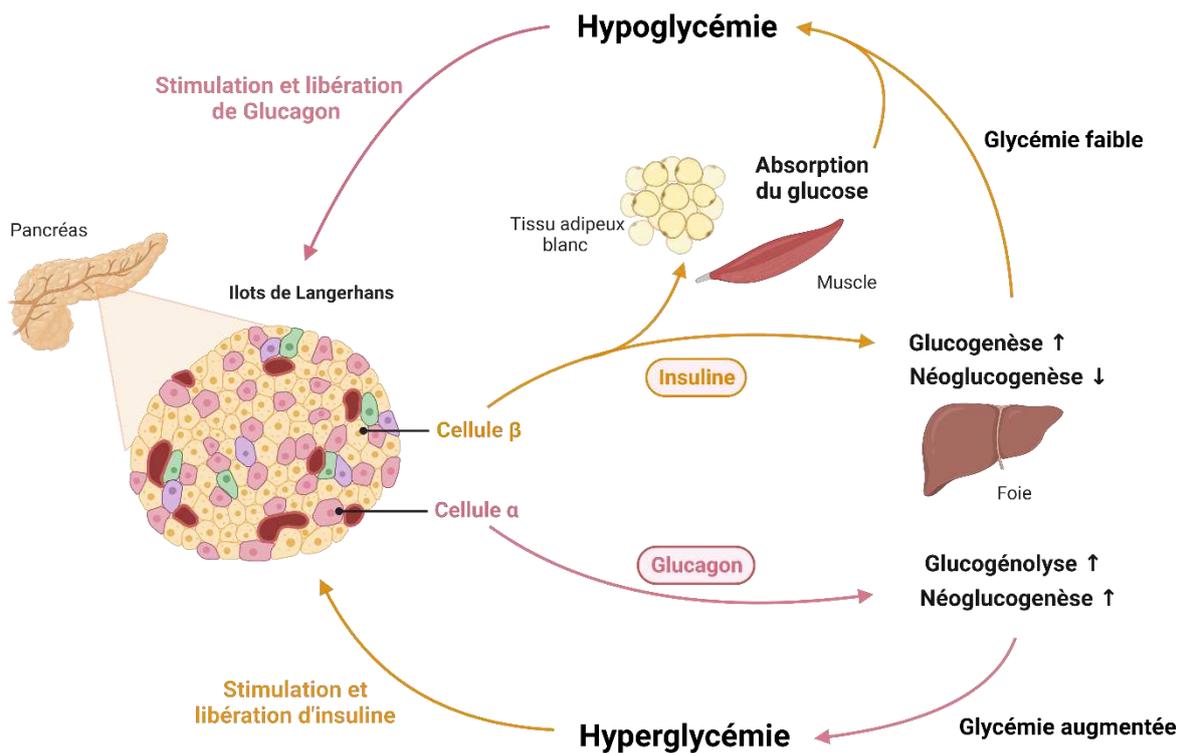


Figure 12 : Régulation de la glycémie par les îlots pancréatiques. Les cellules β des îlots de Langerhans sécrètent l'insuline en réponse à une augmentation du taux de glucose dans le sang (hyperglycémie). L'insuline libérée dans le sang favorise l'absorption du glucose par les tissus cibles : foie, tissu adipeux et muscles. A l'inverse, quand le taux de glucose sanguin est trop faible (hypoglycémie), les cellules α des îlots de Langerhans sécrètent le glucagon. Le glucagon stimule des voies de signalisation dans les tissus comme le foie favorisant la glycogénolyse et la néoglucogénèse. *Adapté de (Pasquier, 2016)*

2. La cellule β du pancréas

Les cellules β pancréatiques sont la composante principale des îlots de Langerhans chez toutes les espèces. Leur principale fonction est de détecter l'augmentation des concentrations sanguines de glucose et d'induire la sécrétion d'insuline. Cette détection repose sur l'expression du transporteur de glucose GLUT2. Après son internalisation, le glucose est phosphorylé par la glucokinase en glucose-6-phosphate, favorisant la formation de pyruvate (processus de glycolyse) et l'activation du cycle Krebs dans les mitochondries (Cf figure 13). La métabolisation du glucose par les mitochondries entraîne une augmentation du ratio ATP/ADP induisant la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP et la dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation provoque, à son tour, l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. L'apport de calcium entraîne finalement l'exocytose des granules d'insuline ; ce processus est régulé par les protéines de la famille SNARE qui jouent un rôle central dans la fusion des vésicules d'insuline avec la membrane plasmique (Röder et al., 2016).

Du fait de leur rôle majeur dans la régulation du métabolisme du glucose, les cellules β possèdent un certain nombre de récepteurs membranaires permettant de détecter les signaux environnementaux afin de moduler la sécrétion d'insuline, tels que le récepteur à l'insuline (*insulin receptor* ou InsR) ainsi que du récepteur à l'IGF-1 (*insulin growth factor 1 receptor* ou IGF-1R) impliqués dans la fonction et la croissance des cellules β . Ces voies de signalisation sont également contrôlées par l'EGFR (*epithelial growth factor*) (Stützer et al., 2012).

La sécrétion d'insuline peut également être induite par d'autres médiateurs, tels que GLP1 (*glucagon like peptide 1*) qui stimule la sécrétion d'insuline par augmentation des niveaux d'AMP cyclique (*Cyclic adenosine monophosphate*) de la même façon que la fixation des acides gras au niveau GPR40 (*G-protein coupled receptor 40*). A l'inverse, le récepteur adrénergique α inhibe la libération d'insuline par exocytose.

Les cellules β sont étroitement liées les unes aux autres, favorisant les communications intercellulaires et facilitant la sécrétion d'insuline (Tokarz et al., 2018). Les cellules β expriment des molécules d'adhérence telles que la cadhérine E ou des molécules de la superfamille des immunoglobulines. La connexine 36, impliquée dans la formation des jonctions serrées entre les cellules β , favorise la coordination du signal calcique nécessaire à la synchronisation des cellules β . Le récepteur à l'éphrine A est impliqué dans la régulation paracrine de la sécrétion d'insuline (Stützer et al., 2012).

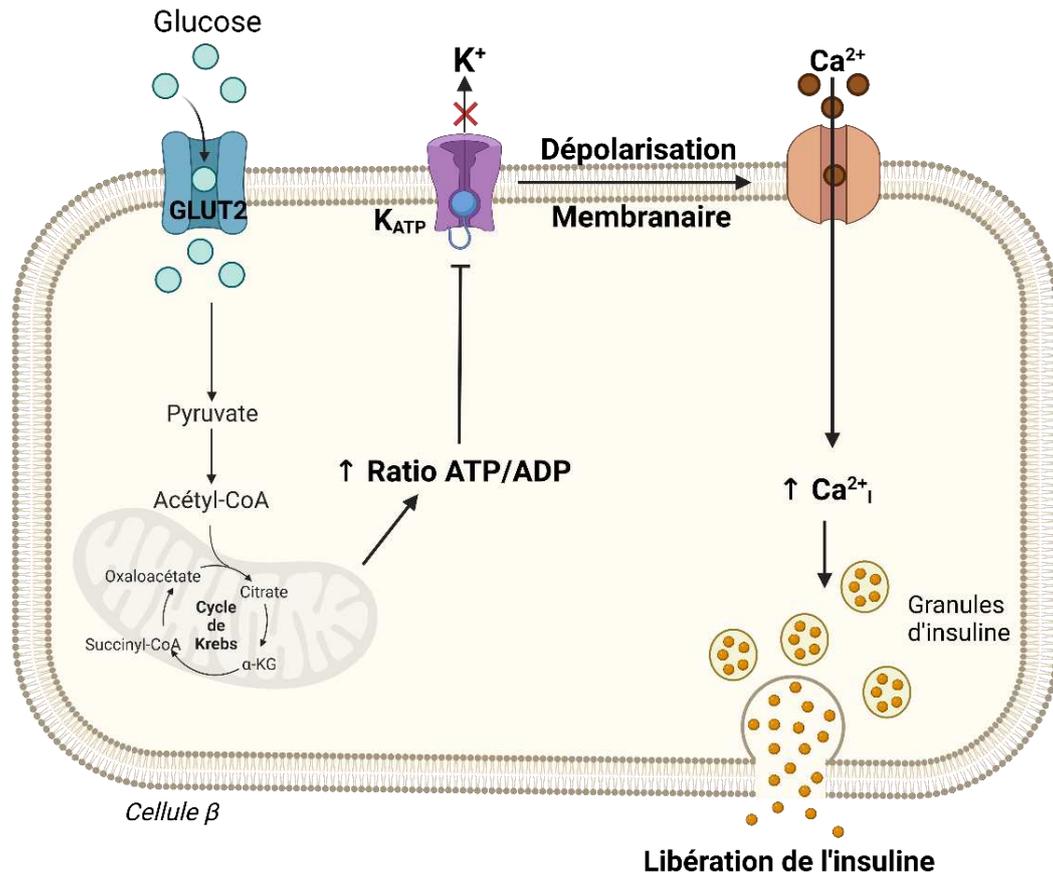


Figure 13 : Stimulation des cellules β pancréatiques et sécrétion d'insuline. Le glucose exogène est transporté dans la cellule β pancréatique par le transporteur GLUT2 où il est soumis à la glycolyse. L'élévation du niveau d'ATP par l'activation du cycle de Krebs dans les mitochondries altère le ratio ATP/ADP qui entraîne la fermeture des canaux potassiques (K^+) sensibles à l'ATP. En conséquence, la membrane lipidique se dépolarise et les canaux calciques voltages dépendants s'ouvrent. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire induit la fusion des granules d'insuline avec la membrane et la libération de l'hormone dans le milieu extracellulaire. *Adapté de (Röder et al., 2016).*

3. L'insuline

Découverte en 1921, l'insuline est une hormone produite par les cellules β dans les îlots de Langerhans du pancréas endocrine. Elle est codée par le gène localisé sur le chromosome 11 chez l'homme (Tokarz et al., 2018). Chez la souris, il existe deux protéines d'insuline codées par deux gènes *INS1* et *INS2*. *INS2* présente une structure similaire à celle de l'homme (3 exons et 2 introns) alors qu'*INS1* est composé uniquement de 2 exons et toute la séquence codante se localise dans l'exon 2 (Irwin, 2021). Malgré ces différences de structure, les deux gènes sont exprimés de façon équivalente.

a. Synthèse de l'insuline

La régulation de la production d'insuline par les cellules β est contrôlée essentiellement par le taux de glucose. L'augmentation du taux de glucose sanguin favorise la transcription du gène codant l'insuline qui est régulée par les facteurs de transcription *Pdx1*, *Mafa* et *Neuro-D1* qui agissent de façon coordonnée et synergique. Ainsi, la présence de sites de liaison nommés A3, E1 et C1 sur le promoteur du gène vont permettre la liaison, respectivement, de *Pdx1*, *Neuro-D1* et *Mafa* (Andrali et al., 2008). L'augmentation du taux de glucose module de façon différente ces trois facteurs de transcription. Une fois phosphorylé, *Pdx1* va interagir avec différents coactivateurs lui permettant de se lier au domaine A3. *Neuro-D1*, initialement localisé dans le cytosol, sera transloqué dans le noyau suite à des glycosylations et des phosphorylations induites par l'apport de glucose. La transcription de *Mafa* est induite uniquement lorsqu'il y a une augmentation du glucose (Andrali et al., 2008).

La biosynthèse de l'insuline commence par la traduction de la préproinsuline, précurseur de 110 acides aminés composée d'un peptide signal N-terminal, d'une chaîne B, d'un peptide C et d'une chaîne A au niveau C-terminal (Vasiljević et al., 2020) (Cf figure 14). Le peptide signal de la préproinsuline est clivé dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER), induisant la production de proinsuline ; ce clivage du peptide signal induit la formation de ponts disulfure entre la chaîne A et B (Tokarz et al., 2018; Vasiljević et al., 2020). La proinsuline est ensuite transportée dans l'appareil de Golgi où elle est stockée dans des granules sécrétoires. Finalement, le clivage du peptide C transforme la proinsuline en insuline composée uniquement des chaînes A et B. L'insuline mature est stockée dans les granules au niveau du cytoplasme dans l'attente de sa sécrétion par exocytose (Tokarz et al., 2018; Vasiljević et al., 2020). Les granules d'insuline sont fixés au niveau de la membrane plasmique grâce aux protéines SNARE.

Lorsque les cellules β reçoivent un signal de sécrétion d'insuline, les granules sont libérées dans le tissu interstitiel du pancréas pour réguler l'apport alimentaire et l'augmentation du glucose sanguin (Vasiljević et al., 2020).

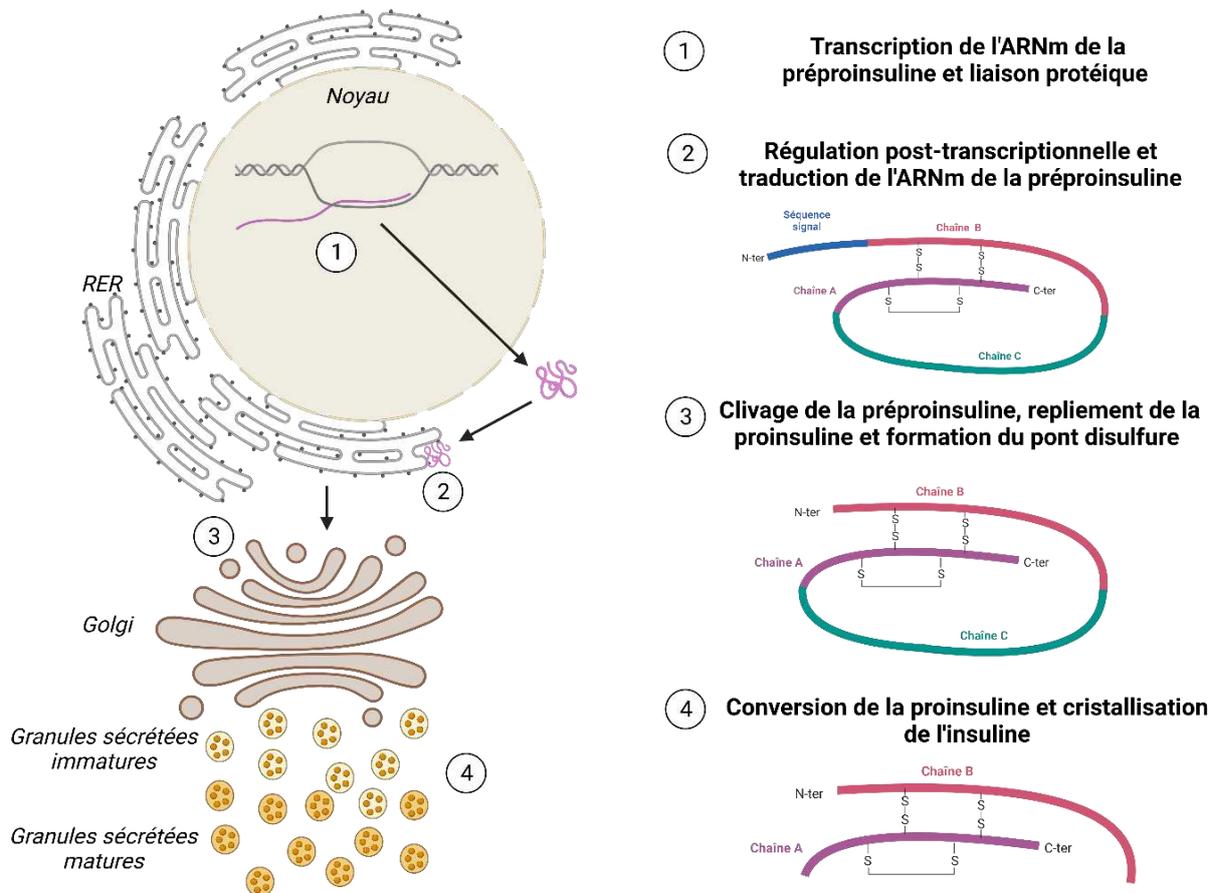


Figure 14 : Synthèse et sécrétion de l'insuline. L'ARNm de l'insuline est transcrit dans le noyau des cellules β pancréatiques puis traduit sous forme de préproinsuline dans le réticulum endoplasmique rugueux. Une fois transporté dans l'appareil de Golgi, le peptide signal est clivé pour donner forme à la proinsuline. La forme mature de l'insuline sera conservée dans des granules cytoplasmiques avant sa libération dans l'organisme. *Adapté de (Tokarz et al., 2018; Vasiljević et al., 2020).*

b. Action de l'insuline sur les tissus cibles

Le premier organe entrant en contact avec l'insuline après sa libération est le foie qui va consommer et éliminer une grande partie de l'insuline sécrétée (50 à 80%), agissant comme le premier régulateur de la concentration d'insuline sanguine. L'insuline favorise l'absorption du glucose par les hépatocytes qui sera converti en glycogène (glycogénèse), en acides gras ou en triglycérides (TG) (Rahman et al., 2021). L'insuline favorise la vasodilatation et donc son transport vers les muscles et le tissu adipeux. Le muscle squelettique est une des cibles majoritaires de l'insuline puisqu'il consomme près de 70% de la quantité totale de glucose pour assurer la production d'ATP nécessaire à sa fonction. L'insuline favorise également l'absorption du glucose et des acides gras dans le tissu adipeux et inhibe la lipolyse (Tokarz et al., 2018). Enfin, l'insuline peut également réguler les fonctions métaboliques de

nombreux autres types cellulaires, tels que les macrophages (Dror et al., 2017), les cellules β et les cellules endothéliales (Haeusler et al., 2018).

c. La signalisation induite par l'insuline

Le récepteur InsR ne participe pas seulement à la régulation du métabolisme, mais également à la croissance et la régulation du vieillissement. InsR appartient à une sous-famille de récepteurs à tyrosine kinase dont font également partie le récepteur IGF-1R et le récepteur lié à l'insuline (*Insulin receptor-related receptor* ou INSRR).

Le récepteur InsR est composé de deux sous-unités α et β liées par un pont disulfure pour former un tétramère glycoprotéique. Il existe deux isoformes induites par un épissage alternatif de l'exon 11 : IR-A et IR-B (Forbes, 2023). La liaison de l'insuline à la sous-unité α du récepteur induit la phosphorylation de la sous-unité β et le changement conformationnel du récepteur nécessaire à son activation. Cette activation par autophosphorylation favorise le recrutement de substrats intracellulaires nécessaires à l'activation des voies de signalisation sous-jacentes (Cf figure 15). Parmi ces substrats intracellulaires, les mieux identifiés sont les protéines IRS (*Insulin receptor substrate*) et Shc (*Src-homology-2*) (Saltiel, 2021). Le recrutement des molécules IRS-1 et IRS-2 active la voie de signalisation PI3/Akt tandis que la phosphorylation de Shc active la voie de signalisation des MAPK (Forbes, 2023; Saltiel, 2021). L'action principale de l'insuline utilise la voie PI3K/Akt. L'insuline, par l'activation de la voie PI3K/Akt inhibe également la synthèse de glycogène et d'acide gras (Rahman et al., 2021). L'activation de la voie des MAPK promeut la division cellulaire, la synthèse protéique et la croissance cellulaire (Rahman et al., 2021). La phosphorylation d'Akt module la signalisation induite par le glucose en favorisant notamment la translocation du transporteur au glucose GLUT4 à la surface membranaire. Au stade basal, la moitié des transporteurs GLUT4 sont séquestrés dans des vésicules intracellulaires. L'insuline provoque l'expression de GLUT4 à la membrane plasmique, facilitant l'entrée du glucose.

Les réponses induites par l'insuline doivent être finement régulées pour maintenir l'homéostasie du glucose. Ainsi, une fois l'insuline dissociée, l'activation du récepteur de type tyrosine kinase est inhibée sous l'action des protéines phosphatases (PTPases).

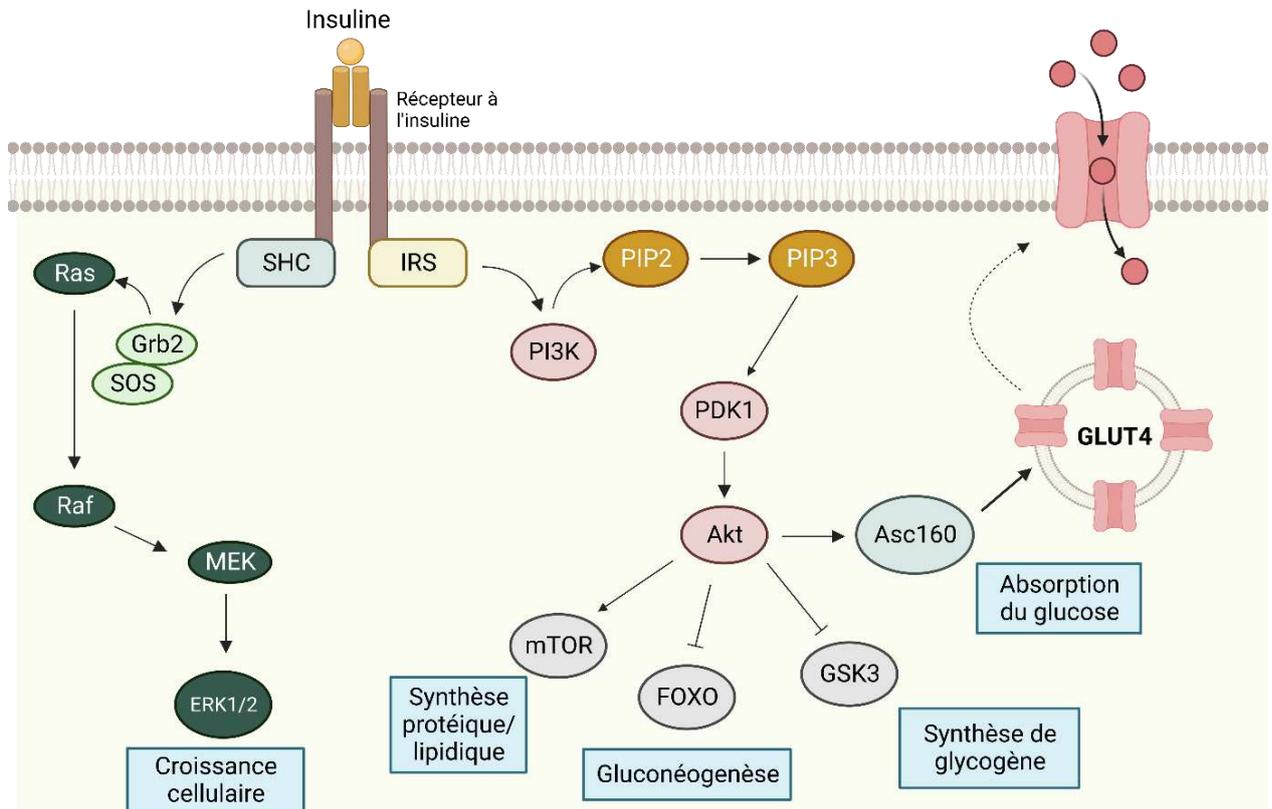


Figure 15 : Activation de la signalisation induite par l'insuline. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation de résidus tyrosines kinase spécifiques. Une fois activé, le récepteur à l'insuline recrute des protéines adaptatrices pour initier une cascade de phosphorylation entraînant l'activation et la répression d'un réseau protéique qui médient les effets de l'insuline sur la production du glucose, son utilisation et son absorption de même que la synthèse de glycogène, de protéines et de lipides. *Adapté de (De Meyts, 2000; Haeusler et al., 2018).*

d. Les membres de la superfamille de l'insuline

L'insuline appartient à une famille d'hormones comprenant les facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGF I et II) ainsi que de 7 membres de la famille des peptides de type relaxine (Shabanpoor et al., 2009). Les analyses génomiques et phylogéniques ont permis d'identifier des homologies au niveau de la structure des membres de cette superfamille. Chaque membre possède 4 segments fonctionnels comprenant un signal N-terminal impliqué dans la sécrétion, une chaîne B conservée, un peptide C non conservé et une chaîne A au niveau C-terminal. Tous les membres sont, comme l'insuline, exprimés sous la forme de pré-hormone.

IGF-1 est synthétisé majoritairement par le foie sous l'action de l'hormone de croissance. IGF-1, qui circule sous la forme d'un complexe avec les protéines de liaison à l'IGF (*IGF binding protein* ou IGF-BP), agit comme un facteur de croissance au niveau local. IGF-1 se lie aux récepteurs IGF-1R et IGF-

2R ainsi qu'au récepteur InsR. IGF-1 est impliqué dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Shabanpoor et al., 2009). IGF-2 est surtout impliqué dans la croissance foetale et plus particulièrement dans le développement musculaire et osseux (Shabanpoor et al., 2009).

Les relaxines jouent des rôles pléiotropes en fonction des récepteurs auxquelles elles se fixent (Relaxin Family Peptide Receptors ou RXFP). La majorité des relaxines, telles que la relaxine 2, Insulin-like 3 (INSL3) et INSL6, régulent la fertilité. INSL3 et INSL4 sont également impliquées dans la croissance foetale et la relaxine 2 est définie comme une hormone de grossesse. La relaxine 3 jouerait un rôle dans l'homéostasie énergétique ainsi que dans la régulation de l'appétit tandis qu'INSL5 aurait des propriétés neuroendocrines (Shabanpoor et al., 2009).

Ces hormones présentent des homologies de structure avec l'insuline et pour certaines sont capables de se lier au récepteur à l'insuline. Cependant, leurs fonctions sont assez éloignées de celle de l'insuline, et notamment la régulation glycémique.

IV. L'obésité

La situation d'obésité est observée quand l'excès de graisse corporelle a un impact sur la santé de l'individu. Elle se définit par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m² (Apovian, 2016). Cette pathologie est un phénomène sociétal qui touche majoritairement les pays développés et dont l'incidence ne cesse d'augmenter. En 2016, 13% de la population adulte mondiale était en situation d'obésité d'après l'OMS et les statistiques annoncent que 51% de la population mondiale sera obèse en 2030 (Ahmed et al., 2021). La genèse d'une situation d'obésité peut être multifactorielle, intégrant des causes environnementales (alimentation riche en sucres et en graisses associée à un mode de vie sédentaire), génétiques (défaut d'expression des gènes associés au stockage du gras) ou associées à l'âge (diminution de la dépense énergétique au repos en vieillissant et augmentation des graisses viscérales) (Ahmed et al., 2021). L'obésité favorise l'initiation d'anomalies de sécrétion et de sensibilité à l'insuline. Ainsi, dans plus de 80% des cas d'obésité, les patients développent une résistance à l'insuline à un moment de leur vie (Ahmed et al., 2021). Cela est principalement dû à un défaut de fonctionnement du tissu adipeux.

1. Structure du tissu adipeux :

Le tissu adipeux (TA) est un organe endocrine qui comprend le tissu adipeux blanc (TAB) et le tissu adipeux brun. Ces tissus se composent de différents types cellulaires, organisés en deux composantes : les adipocytes matures (20 à 30% des cellules totales) et le stroma-vasculaire,

composée de cellules-souches mésenchymateuses, de pré-adipocytes, de fibroblastes, de cellules endothéliales, de progéniteurs vasculaires et de cellules immunitaires (Barilla et al., 2021).

Chez les mammifères, il existe trois types d'adipocytes : les blancs, les bruns et les beiges. Les adipocytes du tissu adipeux brun contiennent des gouttelettes lipidiques multiloculaires ainsi qu'un grand nombre de mitochondries. Leur rôle principal est de dissiper l'énergie stockée sous forme de chaleur afin de maintenir la température corporelle (Zwick et al., 2018). Le tissu adipeux blanc (TAB) comprend les graisses viscérales (TAV) et sous-cutanées (TASC). Il se caractérise par des adipocytes de tailles variables (de 25 à 200 μm de diamètre) contenant des gouttelettes lipidiques uniloculaires et moins de mitochondries que les adipocytes bruns (Barilla et al., 2021; Luo and Liu, 2016). Alors que la majorité du TAB est représenté par le TASC (80%), le TAV (10-20% du tissu adipeux blanc) est associé à des troubles métaboliques (Zwick et al., 2018). Les adipocytes du TAB jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie métabolique par le stockage et la libération des acides gras (Morigny et al., 2021).

a. Fonctions métaboliques des adipocytes :

Le rôle majeur du tissu adipeux est de stocker les triglycérides par le phénomène de lipogenèse et de libérer des acides gras libres (*Free fatty acid* ou FFA) par le phénomène de lipolyse (Luo and Liu, 2016; Morigny et al., 2021). La lipogenèse est stimulée par l'ingestion de nourriture et favorise la synthèse de novo d'acides gras à partir de l'acétyl-coenzyme A et la biosynthèse des triglycérides (TGs). Le glucose participe à la lipogenèse du tissu adipeux par la stimulation de sécrétion d'insuline. Une fois sécrétée, l'insuline favorise l'absorption du glucose par les adipocytes et stimule les voies de signalisations nécessaires à la synthèse du cholestérol, des acides gras, des TGs et des phospholipides (Luo and Liu, 2016). De la même façon, la lipoprotéine lipase (LPL) entraîne l'hydrolyse des acides gras à partir des TGs circulants pour faciliter leur entrée dans les adipocytes (Barilla et al., 2021; Luo and Liu, 2016).

À l'inverse, en condition de jeûne, la voie catabolique de la lipolyse facilite l'utilisation des TGs stockés dans les adipocytes afin de libérer des acides gras libres ainsi que du glycérol. Les acides gras libres seront oxydés par les organes en demande énergétique et le glycérol sera transporté dans le foie pour la néoglucogenèse. Le jeûne est associé à des niveaux diminués d'insuline et plus élevés de glucagon qui sont également des signaux déclencheurs des voies de signalisation de la lipolyse (Luo and Liu, 2016). La balance entre la lipogenèse et la lipolyse permet donc de maintenir une homéostasie énergétique et une sensibilité à l'insuline (Luo and Liu, 2016).

b. Expansion du tissu adipeux en condition d'obésité

Les adipocytes sont produits constamment à partir des cellules-souches qui se différencient en pré-adipocytes puis en adipocytes. En fonction de l'apport lipidique, la taille et la masse des adipocytes varient par les phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie. L'hypertrophie caractérise une augmentation de la taille des adipocytes préexistants tandis que l'hyperplasie induit la génération en grande quantité d'adipocytes de petite taille à partir des pré-adipocytes (Luo and Liu, 2016). En condition d'obésité, la balance énergétique positive augmente les mécanismes d'hypertrophie et d'hyperplasie pour permettre l'accumulation des graisses (Cf figure 16). Lorsque la capacité de stockage est dépassée, les graisses s'accumulent dans les tissus ectopiques comme le foie, le muscle squelettique et le pancréas entraînant des altérations métaboliques. L'apport trop important d'acides gras libres au niveau du foie augmente la néoglucogenèse et induit un défaut de sécrétion d'insuline responsable d'hyperinsulinémie. L'hyperinsulinémie diminue la sensibilité du récepteur à l'insuline au niveau des muscles, réduisant ainsi la capacité d'absorption du glucose et facilitant le développement d'une résistance à l'insuline. En parallèle, les cellules β s'expandent et produisent plus d'insuline pour compenser un taux de glucose sanguin élevé. Au fil du temps, cette surproduction induit la destruction des cellules β , qui est à l'origine de l'hyperglycémie et donc du développement d'un diabète de type 2 (Barilla et al., 2021).

c. Activité endocrine du tissu adipeux

Le TA est considéré comme un organe endocrine par sa capacité à sécréter des nombreux médiateurs qui régulent le métabolisme et l'inflammation. Ces facteurs sont appelés adipokines et leur nombre ne cesse d'augmenter au fil des recherches (plus de 600 adipokines identifiées à ce jour) (Taylor, 2021). Première adipokine à avoir été identifiée, la leptine est une hormone de satiété codée qui agit au niveau des cellules hypothalamiques pour contrôler l'appétit et les dépenses énergétiques (Luo and Liu, 2016; Taylor, 2021). Son inhibition (souris ob/ob) ou l'inhibition de son récepteur (souris op/op) favorise le développement d'une obésité chez les souris. En condition d'obésité, les patients présentent une quantité de leptine importante qui entraîne une résistance à cette dernière. La leptine favorise aussi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-6 (Taylor, 2021). Le TA produit également l'adiponectine qui est l'adipokine la plus abondante de la circulation. Elle participe au maintien de la sensibilité à l'insuline des tissus cibles (foie, muscle squelettique). Elle se comporte comme une cytokine anti-inflammatoire (inhibition de la production d'IL-6 et de TNF α , induction de la production d'IL-10) et ses taux sont diminués en situation d'obésité (Taylor, 2021). Le TA sécrète de la même façon de nombreuses cytokines impliquées dans le recrutement des cellules de l'immunité innée au niveau local (Taylor, 2021). L'excès de masse grasseuse, associé à des

modifications métaboliques, entraîne donc un déséquilibre dans la sécrétion d'adipokines qui favorise la genèse de l'inflammation chronique. (Cf figure 16)

2. L'inflammation naissante dans le TAB

Il est aujourd'hui bien établi que l'obésité est associée à une inflammation chronique de bas grade. L'apport énergétique trop important pour les capacités métaboliques des adipocytes entraîne l'augmentation des taux de glucose et de lipides circulants qui activent l'inflammasome et les TLRs notamment (Rohm et al., 2022). L'hypoxie est également un facteur clé dans l'initiation de l'inflammation au niveau du TAV. L'hypertrophie des adipocytes est associée à une diminution des taux d'oxygène au niveau tissulaire favorisant l'expression de HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*) dont l'activation initie l'expression de chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes dans le TAV (Rohm et al., 2022) (Cf figure 16). Les macrophages du TAV (ATMs) sont les cellules immunitaires les plus abondantes et jouent un rôle prépondérant dans l'inflammation induite par l'obésité et dans le développement d'une résistance à l'insuline (Caslin et al., 2020). Chez l'homme et la souris, l'accumulation de macrophages est directement corrélée à l'augmentation de l'adiposité (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). Les autres cellules myéloïdes participent à l'inflammation locale en favorisant le recrutement et les modifications phénotypiques des ATMs (Rohm et al., 2022). Des populations lymphocytaires sont également présentes avec notamment une augmentation de la fréquence de lymphocytes Th1 sécrétant de fortes quantités d'IFN γ et des lymphocytes T CD8 $^+$ impliqués dans le recrutement des monocytes.

a. Phénotype et rôle des macrophages du TAB dans l'inflammation associée à l'obésité

En conditions physiologiques, les macrophages du tissu adipeux présentent un profil de type immunorégulateur M2. De manière schématique, les macrophages de type M2 sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie par différents mécanismes : l'élimination des adipocytes mourants, la régulation de l'adipogenèse, l'oxydation des acides gras et la production d'IL-10 (via sa capacité à maintenir une sensibilité à l'insuline) (Caslin et al., 2020; Orliaguet et al., 2020). La situation d'obésité entraîne un recrutement de macrophages présentant un profil inflammatoire au niveau du TAV (Lumeng et al., 2007; Orliaguet et al., 2020). Avec l'évolution des techniques d'analyses, les études actuelles montrent que les ATMs accumulés dans le TAV pendant l'obésité ont des profils hétérogènes (Caslin et al., 2020). Le microenvironnement du TAV a donc un impact direct sur l'identité des ATMs ainsi que des monocytes recrutés. A titre d'exemple, nous pouvons citer la molécule CD9 qui a été identifiée comme un nouveau marqueur phénotypique des ATMs chez l'homme et la souris. Son

expression permet de distinguer les ATMs présents dans l'espace interstitiel ($CD11b^+/Ly6c^+CD9^-$) de ceux qui s'accumulent dans des structures en couronne qui apparaissent avec l'expansion du TAV ($CD11b^+/Ly6c^+, CD9^+$). Les ATMs $CD9^+$ expriment fortement des gènes liés au métabolisme lipidique (*Lpl, Plin 2, CD63*), aux voies lysosomales (*Acp5, Lamp2*) et à l'inflammation (*Il1, Il18, tnfa, ccl2*) (Hill et al., 2018). Cette diversité phénotypique dans le modèle murin est associée à des profils métaboliques associant des capacités de glycolyse (retrouvée chez les macrophages M1 générés *in vitro*) et de phosphorylation oxydative (utilisée par les macrophages de type générés M2 *in vitro*) (Caslin et al., 2020). Les ATMs accumulés en condition d'obésité sont donc des acteurs majeurs dans le développement de l'inflammation chronique et l'apparition d'une résistance à l'insuline en condition d'obésité (Johnson and Olefsky, 2013; Orliaguet et al., 2020) (Cf figure 16).

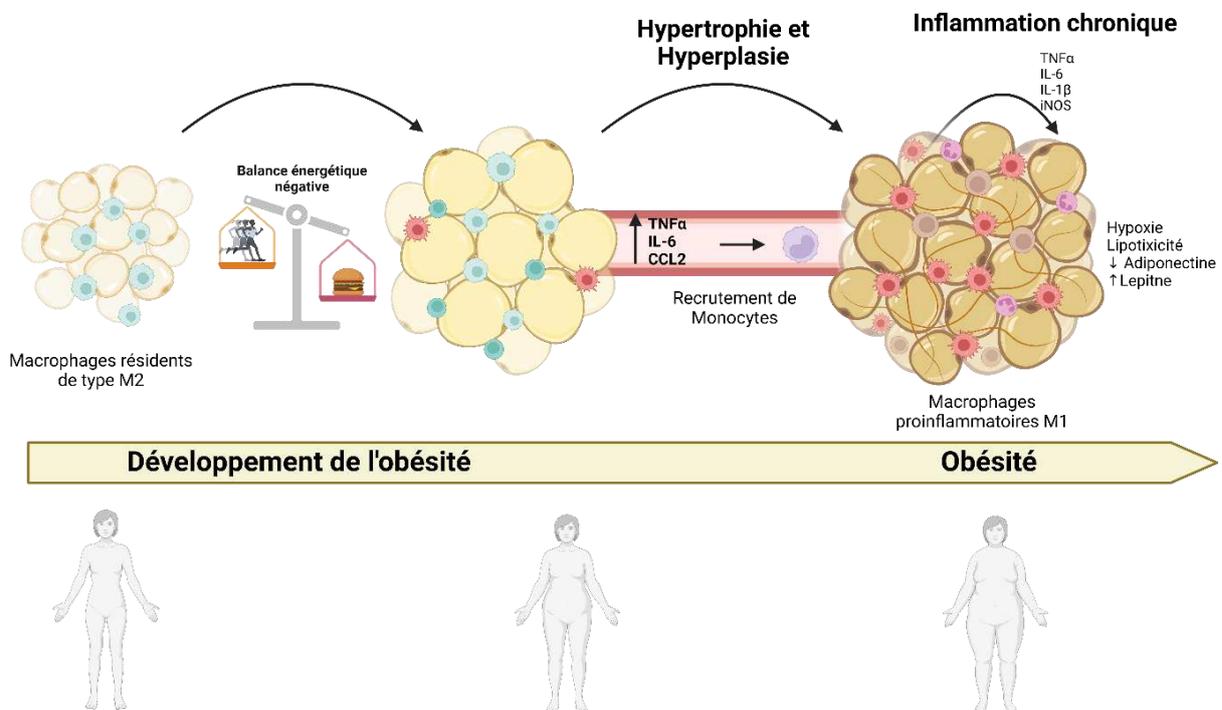


Figure 16 : Conséquences métaboliques et inflammatoires de l'expansion du tissu adipeux en condition d'obésité. Le déséquilibre de la balance énergétique favorise l'expansion progressive du tissu adipeux par des phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie sur les adipocytes. Cette expansion du tissu adipeux entraîne le recrutement de monocytes qui se différencient en macrophages pro-inflammatoires chez les personnes en situation d'obésité. Le déséquilibre de sécrétion des adipokines, l'hypoxie, et la lipotoxicité sont les conséquences de l'incapacité des adipocytes à stocker les graisses. L'infiltrat immunitaire associé promeut l'inflammation locale par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

b. Résistance à l'insuline induite par l'obésité et impact sur les fonctions du pancréas

Un défaut d'action et/ou de sécrétion de l'insuline entraîne un déséquilibre homéostatique responsable de différents syndromes métaboliques. La situation d'obésité favorise l'hyperglycémie consécutive à une diminution de l'utilisation du glucose par les tissus périphériques et donc d'une glycémie sanguine élevée. Ce déséquilibre est généralement associé au développement d'une résistance à l'insuline traduite par une augmentation des quantités d'insuline circulantes. Cette hyperinsulinémie peut être la conséquence d'une production trop importante de l'hormone par les îlots pancréatiques et/ou par une diminution de son élimination systémique (Johnson and Olefsky, 2013; Rahman et al., 2021).

V. Impact de l'obésité sur le pancréas

1. Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie métabolique et inflammatoire chronique induite par une situation d'obésité et qui a été responsable de 4,2 millions de décès en 2019. Le développement d'un DT2 favorise l'apparition de complications pour les patients telles que des pathologies cardiovasculaires, des pathologies rénales ou encore cérébrales. Aux Etats-Unis, les maladies coronariennes, les maladies vasculaires périphériques et les maladies cérébrovasculaires sont les premières causes de décès (Zheng et al., 2018). Dans plus de 90% des cas, les patients atteints de DT2 présentent une anomalie de sécrétion d'insuline par les cellules β associée à une résistance à l'insuline des tissus cibles ainsi qu'une réponse de sécrétion compensatoire de l'hormone inappropriée (Galicia-Garcia et al., 2020). Les symptômes métaboliques et inflammatoires associés à la maladie affectent le pancréas, le foie, le muscle squelettique, les reins, le cerveau, l'intestin grêle et le tissu adipeux. Au niveau du pancréas, les cellules β qui ont, dans un premier temps augmenté leur capacité de production d'insuline, vont finir par mourir sous l'action de différents facteurs toxiques.

2. L'obésité et les îlots de Langerhans

a. L'inflammation chronique dans les îlots de Langerhans

L'augmentation des taux d'acides gras libres circulants et de glucose favorise la destruction des cellules β par apoptose et le développement de l'inflammation chronique dans les îlots de Langerhans. Madler et coll. ont montré que les îlots humains cultivés en présence de fortes quantités de glucose présentaient une capacité de production d'IL-1 β accrue ; ce phénomène a également été observé *in vivo* chez des gerbilles développant un diabète. Cette apoptose des cellules β induite par

l'IL-1 β est prévenue par un antagoniste de l'IL-1R (IL-1Ra) (Maedler et al., 2002). En parallèle, les acides gras libres sont aussi responsables de l'augmentation d'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et la chimiokine CXCL-8 par les îlots pancréatiques (Böni-Schnetzler et al., 2009) ainsi que l'activation de l'inflammasome NLRP3 qui réduit la tolérance au glucose et favorise la résistance à l'insuline in vivo (Wen et al., 2011).

La lipotoxicité et la glucotoxicité participent à l'augmentation de la synthèse du polypeptide amyloïde des îlots (*islet amyloid polypeptide* ou IAAP) qui favorise l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique rugueux ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ou ROS) (Galicía-García et al., 2020; Gao et al., 2022). Masters et coll. ont montré que les dépôts amyloïdes étaient impliqués dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-1 β par les macrophages murins. Ainsi, les souris transgéniques produisant l'IAAP humain présentent une perte de cellules β plus importante après un régime HFD et les dépôts d'IAAP sont colocalisés avec l'IL-1 β dans les macrophages (Masters et al., 2010). Ces altérations fonctionnelles favorisent les signaux pro-apoptotiques responsables de la destruction des cellules β et participent au recrutement de macrophages dans les îlots, vecteurs de l'inflammation locale et du DT2 (Gao et al., 2022).

b. Obésité et morphologie des îlots pancréatiques

En situation d'obésité, la résistance à l'insuline est responsable de changements morphologiques au niveau des îlots de Langerhans et plus particulièrement des cellules β . Les travaux chez la souris ont montré qu'après un régime riche en graisse, les îlots de Langerhans présentent une augmentation de la masse des cellules β résultant d'une hyperplasie et corrélée à la prise de poids (Hull et al., 2005; Sachdeva and Stoffers, 2009). Une autre étude a montré que l'augmentation de la prolifération des cellules β s'observait rapidement pendant le régime, dès 7 jours après la mise en place du régime, et était associée à une augmentation précoce de l'expression d'effecteurs comme la cycline D. Cette augmentation de la prolifération des cellules β n'était pas associée à une hypertrophie ou à une génération de nouveaux îlots (Stamateris et al., 2013). En parallèle, des études sur les conséquences d'un apport continu de glucose dans la circulation sanguine chez le rat a montré une adaptation des cellules β conduisant à augmenter la production d'insuline (Sachdeva and Stoffers, 2009; Steil et al., 2001). De la même façon, un modèle d'hyperglycémie par perfusion chez la souris a montré que la réplique des cellules β augmentait de façon significative suite à l'apport de glucose (Alonso et al., 2007; Sachdeva and Stoffers, 2009). Plus récemment, l'étude de l'impact d'un régime HFD chez des souris C57BL6/6NTac a également mis en évidence une augmentation des gènes fonctionnels des cellules β (*Pdx1*, *Mafa*, *Glut2*, *Gck*) dans les îlots de Langerhans 8 semaines après le

début du régime associé à une augmentation la masse des cellules β . Cependant, la persistance du régime sur le plus long terme induit une dysfonction des cellules β associée à un arrêt de la surexpression de ces gènes et une augmentation d'expression des gènes associés à l'UPR reflétant un stress du RE (Gupta et al., 2017). Ces données montrent une adaptation temporelle des cellules β vis-à-vis des changements métaboliques observés chez les souris en situation d'obésité induite (Cf figure 17). Chez l'homme quelques études réalisées sur des échantillons de patients obèses ont montré que la masse des cellules β était augmentée par rapport aux sujets sains (Butler et al., 2003; Saisho et al., 2013).

Les cellules β sont donc sensibles aux changements métaboliques et vont adapter leur morphologie afin de produire les quantités d'insuline adéquates (Sachdeva and Stoffers, 2009).

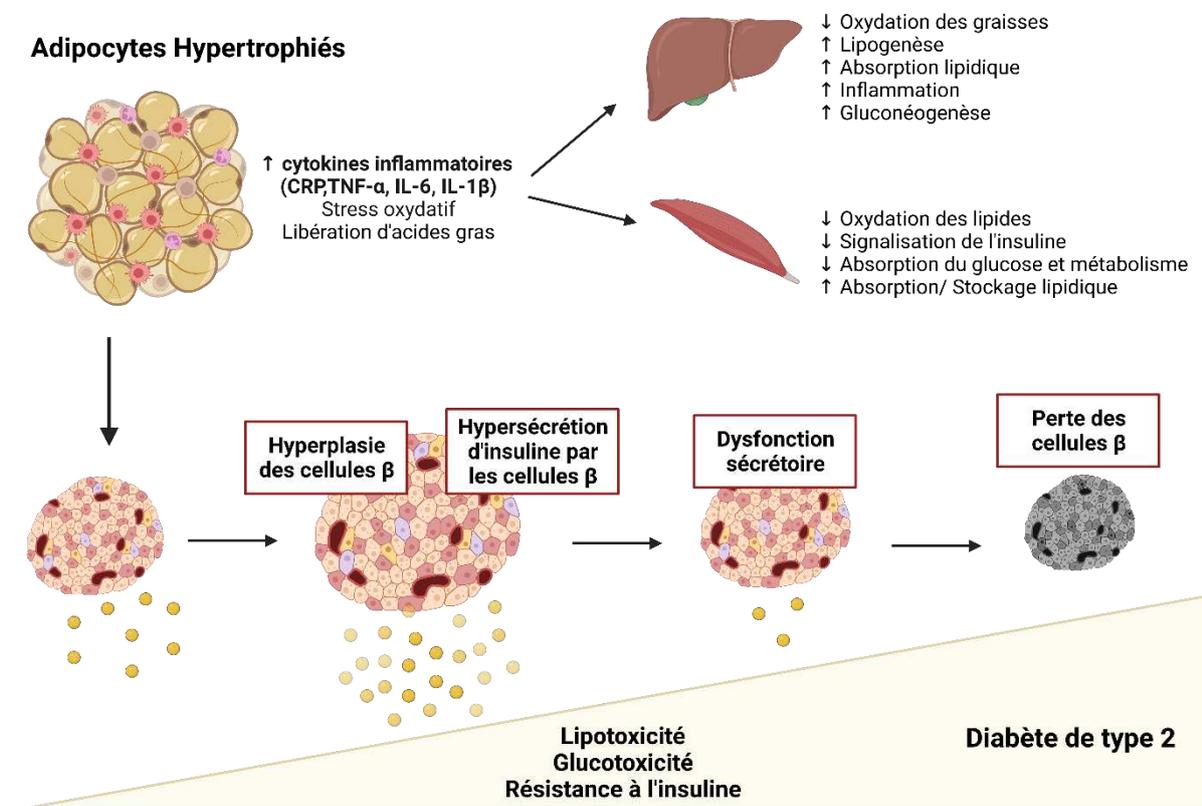


Figure 17 : Impact de l'obésité sur les tissus sensibles à l'insuline et sur la morphologie des îlots pancréatiques. En situation d'obésité, l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline favorisent le stockage des acides gras libres dans les organes associés à l'homéostasie du glucose entraînant des désordres métaboliques dans ces derniers. Au niveau des îlots de Langerhans du pancréas, la masse des cellules β augmente pour compenser la résistance à l'insuline des tissus. Cette surproduction entraîne in fine une dysfonction sécrétoire des îlots et la perte des cellules β au stade DT2.

c. Les macrophages dans le pancréas

i. *Macrophages et communication avec les cellules β*

Les macrophages sont impliqués dans différentes fonctions biologiques pendant le développement, l'homéostasie tissulaire et le remodelage (Cosentino and Regazzi, 2021). Les données chez la souris montrent qu'au niveau pancréatique, les macrophages se développent à partir des précurseurs embryonnaires du sac vitellin au stade E12.5, suggérant un rôle prépondérant de ces derniers au niveau local (Geutskens et al., 2005).

La diminution du nombre de macrophages chez des souris déficientes en M-CSF était associée à une altération de production d'insuline et à un défaut de la morphogenèse des îlots pancréatiques, que ce soit au stade embryonnaire, à l'âge adulte ou pendant la gestation (Banaei-Bouchareb et al., 2004). Plus récemment, dans un modèle d'ablation des cellules pancréatiques chez la souris, l'implication des macrophages dans le remodelage pancréatique a été mis en évidence (Criscimanna et al., 2014). De la même façon, dans un contexte d'ablation partielle des cellules β , le traitement avec le facteur de croissance du tissu conjonctif (conjonctive tissue growth factor ou CTGF) favorise le recrutement des macrophages dans les îlots. Le blocage de leur recrutement diminue drastiquement la régénération des cellules β dans ce modèle (Riley et al., 2015). Les macrophages semblent donc répondre à l'effet chimio attractant du CTGF et participent à la prolifération des cellules β .

Les macrophages sont également capables de répondre aux stimuli libérés par les cellules β pancréatiques. Jonathan R et coll. ont montré que les macrophages des îlots détectent l'ATP libéré par les cellules β lors d'une stimulation au glucose, impactant la mobilité de leurs pseudopodes (Weitz et al., 2018). L'implication de la signalisation purinergique sur les macrophages des îlots a également été mise en évidence dans une étude sur les îlots pancréatiques humains. Les auteurs ont montré que la production et la sécrétion de l'IL-10 et de la métalloprotéase MMP9 était régulée par une signalisation via les récepteurs purinergiques qui est altérée dans les macrophages des îlots de patients DT2 (Weitz et al., 2020). En parallèle, une étude a montré que les macrophages des îlots présentent des filopodes et sont étroitement liés aux vaisseaux sanguins ainsi qu'aux cellules β . Ces filopodes leur permettent de capter des particules issues de la circulation sanguine ainsi que des granules d'insuline (Zinselmeyer et al., 2018).

Les macrophages sont donc des cellules immunitaires ayant une place prépondérante dans la maintenance de l'homéostasie tissulaire au niveau des îlots de Langerhans et un déficit ou des modifications de leur profil semble être impliqué dans des pathologies inflammatoires.

ii. Les macrophages pancréatiques dans l'obésité et le diabète de type 2

Les macrophages situés à la périphérie des îlots de Langerhans (macrophages péri-îlots) se distinguent au niveau fonctionnel des macrophages des îlots (macrophages intra-îlots). Les macrophages du stroma sont issus de l'hématopoïèse primitive et présentent un profil de macrophages de type M2 tandis que les macrophages intra-îlots dérivent de l'hématopoïèse définitive et expriment fortement le CMH de classe II ainsi que les gènes codant l'IL-1 β et le TNF α , reflétant un profil de type M1 (Calderon et al., 2015). Une étude plus récente a montré que ces deux populations pouvaient être différenciées en fonction du niveau d'expression du marqueur de surface CD11c, les macrophages intra-îlots, mais pas ceux localisés en périphérie expriment cette molécule (Ying et al., 2019). Il reste cependant difficile d'établir le profil phénotypique des macrophages pancréatiques en conditions physiologiques, puisque leur polarisation est hétérogène, s'adaptant en permanence à la demande du tissu au long du développement et à l'âge adulte (Gao et al., 2022).

L'inflammation chronique de bas grade associée à l'obésité induit une accumulation de macrophages dans les îlots de Langerhans (Ehse et al., 2007; Ying et al., 2020) (Cf figure 18). Helena Cucak et al. ont étudié la polarisation de ces macrophages accumulés dans le modèle de souris db/db (modèle de souris diabétique) et ont montré que la majorité des macrophages accumulés dans les premiers stades du diabète présentent un profil M1 (Cucak et al., 2014). Plus récemment, une étude sur un modèle d'induction d'obésité par un régime riche en graisse et en sucre a confirmé l'accumulation de macrophages intra-îlots présentant un profil d'expression différents des macrophages en périphérie des îlots. De plus, comparativement à un régime standard, les macrophages des îlots présentent des changements phénotypiques sur un spectre plus large que la dichotomie M1/M2 et dérivent d'une prolifération locale et non d'un recrutement des monocytes sanguins. Enfin, cette accumulation de macrophages chez les souris a un impact sur la fonction des cellules β , notamment en favorisant la prolifération des cellules β et en internalisant également les granules d'insuline qu'elles sécrètent (Ying et al., 2019). Chez l'homme, l'accumulation de macrophages a aussi été mise en évidence chez les personnes atteintes de DT2 (Butcher et al., 2014; Ehse et al., 2007; Kamata et al., 2014). Ces macrophages présentent une expression élevée de cytokines pro-inflammatoires, associée à une réponse altérée des îlots de patients DT2 lors d'une stimulation au glucose (Butcher et al., 2014).

Différentes études ont montré que ces macrophages participent au développement de l'inflammation chronique dans les îlots ainsi qu'au dysfonctionnement des cellules β . Une étude de 2012 a, en particulier, montré que la perfusion de palmitate d'éthyle hydrolysé en acides gras libre chez les souris favorise la dysfonction des cellules β dans les îlots pancréatiques (Eguchi et al., 2012). Le palmitate induit l'activation de la voie TLR4/Myd88 par les cellules β entraînant la libération de cytokines responsables du recrutement de macrophages de type M1 dans les îlots (Eguchi et al., 2012).

D'autre part, le polypeptide amyloïde IAPP favorise le recrutement de macrophages chez les patients DT2 (Kamata et al., 2014). Une étude sur les îlots murins a montré que les dépôts d'IAPP induisaient la production des cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-1 β , le TNF α ou encore l'IL-6 par les macrophages résidents. Un régime HFD chez des souris exprimant l'IAPP altère leur tolérance au glucose et ce processus est associé à une augmentation d'expression d'IL-1 β et une diminution d'expression d'IL-10 par les macrophages (Westwell-Roper et al., 2014). Les cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages activent les voies de signalisation telles que la voie NF κ B et JNK qui inhibent la sécrétion d'insuline après stimulation au glucose et favorisent l'apoptose des cellules β (Ying et al., 2020).

L'inflammation observée dans les organes périphériques en situation d'obésité participent *in fine* au dysfonctionnement des cellules β , notamment par l'intermédiaire d'une augmentation de la fréquence de macrophages activés présentant un profil de type M1 (Gao et al., 2022).

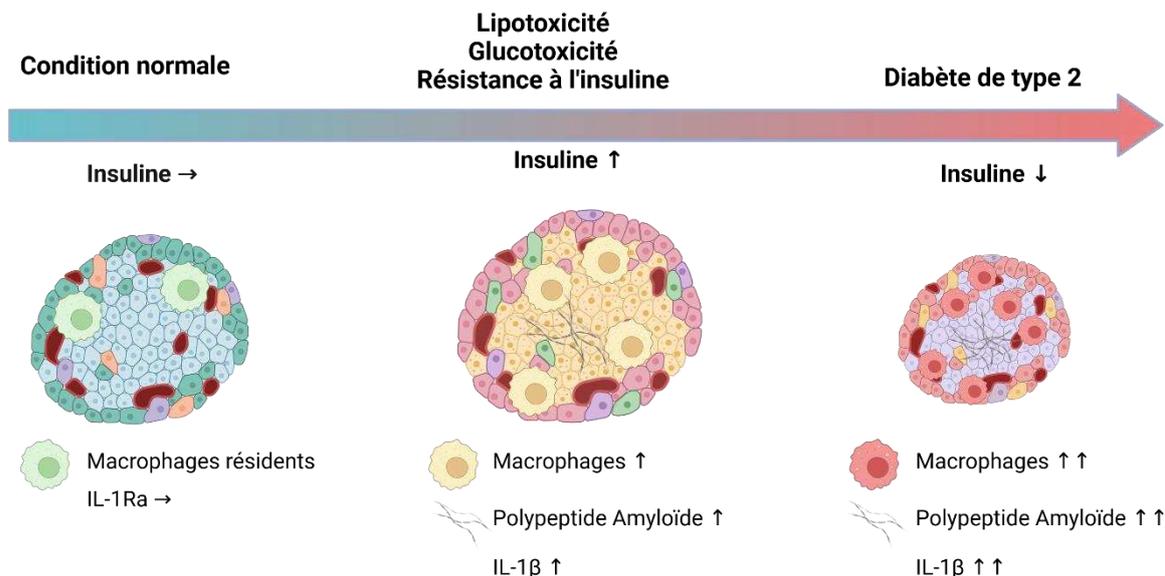


Figure 18 : Îlots de Langerhans et inflammation au cours du développement du diabète de type 2. En condition normale, les îlots de Langerhans présentent une immunité locale et une sécrétion d'insuline dans les conditions homéostatiques. Les déséquilibres métaboliques (lipotoxicité, glycotoxicité et résistance à l'insuline) induits par l'obésité entraînent une augmentation de la masse des cellules β , des macrophages intra-îlots et des cytokines pro-inflammatoires. Le maintien de ce milieu inflammatoire conduit finalement la détérioration de la masse des cellules β et de leur fonction entraînant le développement du diabète de type 2.

VI. Contexte et objectifs de la thèse

L'homéostasie de l'organisme est assurée entre autres par des connections entre le métabolisme et le système immunitaire conduisant à un équilibre contrôlé par l'adaptation des cellules immunitaires à leur environnement. L'immunométabolisme traduit les connections qui existent dans ce dialogue entre le métabolisme et le système immunitaire. Un déséquilibre de cette communication peut être responsable de l'apparition de dysfonctionnements métaboliques pouvant conduire à des situations pathologiques telles que l'obésité ou le diabète. La situation d'obésité induit le développement d'une inflammation initiale dans le tissu adipeux pouvant ensuite atteindre les organes impliqués dans l'homéostasie énergétique comme le foie, les muscles, ou le pancréas. Le développement de l'inflammation chronique dans ce contexte est notamment associé à un déséquilibre entre la quantité de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires produites entre autres par les cellules immunitaires et en particulier par les macrophages.

L'Interleukine-34 (IL-34) est une cytokine initialement identifiée comme un ligand alternatif au récepteur du M-CSF. Tout comme le M-CSF, l'IL-34 favorise la différenciation des monocytes *in vitro* en macrophages M2 immunorégulateurs (IL-10^{high}/IL-12^{low}). L'IL-34 est produite de façon spécifique par les lymphocytes T régulateurs et participe à la tolérance immunitaire par son rôle sur la différenciation des macrophages M2. Ce rôle immunorégulateur peut être impliqué dans des pathologies telles que la fibrose ainsi que dans le microenvironnement tumoral où l'IL-34 agit comme une molécule immunosuppressive. Des études ont également identifié une surexpression d'IL-34 dans des contextes de maladies auto-immunes suggérant un rôle prépondérant de la cytokine dans les mécanismes de réponse inflammatoire et laissent penser que cette cytokine peut présenter deux visages. Les auteurs ont donc conclu que l'IL-34 pouvait être envisagée comme une cible thérapeutique dans des conditions inflammatoires chroniques. Mais, la production d'IL-34 qui peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires suggère que cette augmentation puisse représenter un mécanisme inhibiteur de l'inflammation chronique plutôt que la cause de la maladie.

Au niveau métabolique, l'IL-34 est retrouvée augmentée dans le sérum de patients obèses est produite par les adipocytes. L'obésité est un facteur de risque dans le développement d'un diabète de type 2 et dans ce contexte, des SNPs ont été identifiés sur le gène de l'IL-34 comme facteurs prédictifs du développement d'un DT2. Aussi, une corrélation positive a été mise en évidence entre l'augmentation d'IL-34 circulante chez les patients DT2 et l'index de résistance à l'insuline. D'autres études ont suggéré que l'IL-34 pourrait dans ce cas jouer un rôle sur la sécrétion d'insuline, ceci implique une production locale pancréatique de la cytokine (Chang et al., 2014; Piao et al., 2019).

Au laboratoire, nous avons ainsi identifié pour la première fois une expression constitutive (protéique et transcriptionnelle) de l'IL-34 au niveau des îlots de Langerhans dans le pancréas humain. Nous avons également montré que la cytokine était produite par les cellules β pancréatiques productrices d'insuline.

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse était de comprendre le rôle de l'IL-34 retrouvée dans le pancréas. Pour comprendre les mécanismes locaux impliquant la cytokine, nous avons mis en place au laboratoire un modèle de souris invalidée pour le gène de l'IL-34 au niveau des cellules β pancréatiques uniquement (souris IL-34 ^{Δ Pdx}). Une fois le modèle mis en place, l'objectif a été de comprendre l'implication de l'IL-34 dans l'immunométabolisme des îlots pancréatiques et l'évolution de son expression dans un contexte de désordre métabolique.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Procédures d'expérimentations animales :

1. Génération des souris IL-34^{ΔPdx} :

Les souris transgéniques Pdx-Cre (JAX #014647 ; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) expriment la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur murin Pdx1. Les souris transgéniques IL-34^{ff}, portant un allèle *IL34* sur lequel les introns 2 et 5 sont flanqués des sites LoxP ont été fournies par le Pr Marco Colona (Washington University, St Louis, MO). Pour générer les souris mutantes spécifiques dans le pancréas, les souris Pdx-Cre ont été croisées avec les souris IL-34^{ff} pour obtenir la génération F1 hétérozygote. Les souris mâles Pdx-Cre^{+/-} IL-34^{ff/+} issus de la génération F1 ont ensuite été croisés avec les souris IL-34^{ff} femelles pour générer des souris déficientes pour l'IL-34 dans les cellules β (IL-34^{ΔPdx}). Les souris frères-sœurs n'exprimant pas la recombinaise cre ont été utilisées comme contrôles (IL-34^{ff/f}). Les souris ont été hébergées dans des conditions spécifiques exempts de pathogènes (EOPS). Les expériences ont été réalisées sur les femelles et ont été approuvées et conduites en accord avec le comité d'éthique en expérimentation animale de la région des Pays de la Loire (CEEAPdL) et autorisées par le ministère français de la recherche. (Autorisation APAFIS#8256-2016121823456077/APAFIS #37469-2022052417088984 v3).

2. Génotypage des lignées de souris :

Le génotypage des souris s'effectue suivant le protocole REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Biosystem, California, USA). Les poinçons d'oreilles de souris de 1mm³ sont mis dans 50 μL de solution d'extraction (E7526) afin d'obtenir l'ADN génomique. 12,5 μL de solution de tissus de préparation (T3073) sont ajoutés. La solution est agitée par vortex puis incubée 10 min à température ambiante et 3 min à 95°C. 50 μL de solution de neutralisation (N3910) sont ajoutées. Les solutions finales sont mélangées par vortex puis centrifugées avant l'analyse par PCR.

Les échantillons de PCR contiennent 4μL d'ADN, 1μL de chaque amorce à 10 μmol/L, 10μL de mix de réaction de PCR (Mix de PCR 2X contenant le tampon, le MgCl, les dNTPs, la Taq Polymérase, le colorant REDTaq et l'anticorps JumpStart Taq) et 4μL d'eau pour la PCR ciblant le gène IL-34^{ff} et 2μL d'eau pour la PCR ciblant le gène Cre pour un volume final de 20μL.

L'ADN cible est amplifié dans un thermocycleur avec une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, d'hybridation à 51,7°C et d'extension à 72°C pendant 30 sec. Les produits de PCR migrent par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. L'ADN est visualisé sous U.V.

La PCR de génotypage pour la recombinaison Cre consiste en une double PCR, une permettant d'amplifier le transgène Cre (100 pb) et une contrôlant permettant d'éliminer les faux négatifs (324 pb). La PCR ciblant le transgène IL-34f/f permet de générer deux fragments de 468 et 570 pb discriminant les souris possédant ou non la séquence LoxP. Les amorces de PCR encadrent l'insert LoxP situé sur l'intron 5 (entre les exons 5 et 6).

Tableau 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le génotypage des souris.

Gène	Oligonucléotide	Séquence
Pdx-Cre	Cre sens	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
	Cre antisens	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
	Control sens	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATC
	Control antisens	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
IL-34	IL-34 sens	CCCTGGTCGGCTTTGCATGT
	IL-34 antisens	CCATGGTCAGAGTCCCCAGG

3. Test de tolérance au glucose :

Pour réaliser le test de tolérance au glucose en intrapéritonéale (ipGTT), après une mise à jeun de 5h, les souris reçoivent une injection de D-glucose (Biosolve, Dieuze, France) concentrée à 2g/kg. Le taux de glucose sanguin a été mesuré à 0, 15, 30, 60, 120, 150, 210 et 240 min après l'injection à l'aide du glucomètre Accu-check guide (Accu-check ; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

4. Test de tolérance à l'insuline :

Pour réaliser le test de tolérance à l'insuline en intrapéritonéale (ipITT), suite à une mise à jeun de 5h, les souris reçoivent une injection d'insuline concentrée à 0,5 UI/kg (Sigma-Aldrich). Le taux de glucose sanguin a été mesuré avant l'injection, puis 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 140 min après à l'aide du glucomètre Accu-check guide (Accu-check ; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

5. Dosage d'insuline :

Les souris ont été mise à jeun pendant 5h puis un prélèvement de sang retro-orbital a été réalisé. De la même façon pendant l'ipGTT, un prélèvement de sang au niveau de la veine caudale a été réalisé 15 et 30 min après l'injection de glucose. Les échantillons de sang sont centrifugés pendant 15 min à 2500g à 4°C afin de récupérer le sérum qui a ensuite été congelé à -20°C pour le dosage de l'insulinémie par ELISA.

6. Mise en place du régime « High Fat Diet » (HFD) :

Les souris femelles IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{ff} âgées de 6-7 semaines ont été assignées à 2 groupes de 10 souris de façon aléatoire recevant la nourriture conventionnelle (CD) (SAFE D04 : 18.1% protéines, 8.4% lipides and 73.6 NFE) ou une nourriture riche en graisse (HFD) (SAFE 260HF : 14.4% protéines, 58.6% lipides et 27% NFE) (les deux provenant de SAFE, Rotterdam, The Netherlands). Des échantillons de sang ont été prélevés à 4, 8, 12 et 16 semaines après le début du régime. Des tests de tolérance au glucose ont été réalisés tous les mois pendant les 16 semaines de régime et un test de sensibilité à l'insuline a été réalisé la 15^e semaine. Après 16 semaines de régime, les souris ont été anesthésiées par injection de kétamine (1 mg/mL, Merial SAS, Lyon, France) et xylazine (0,05 mg/mL, Bayer Sante Division Santé Animale, La Garenne-Colombe, France) puis euthanasiées. Différents échantillons tissulaires ont été récupérés pour les analyses.

II. Procédures expérimentales ex vivo :

1. Isolement des îlots de Langerhans :

Après anesthésie par association de xylazine (0,05 mg/mL, Bayer Sante Division Santé Animale, La Garenne-Colombe, France) et de kétamine (1 mg/mL, Merial SAS, Lyon, France) en intrapéritonéale, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Le pancréas a ensuite été perfusé avec 5mL de collagénase de type V (1mg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Une fois complètement gonflé, le pancréas est retiré de l'abdomen puis incubé à 37°C pendant 20 min avec agitation toutes les 5 min. Une fois la digestion terminée, le pancréas est lavé avec le milieu de culture des îlots (HBSS 1X, HEPES 1M, BSA FAA), centrifugé (1200 rpm, 2 min, 4°C) puis filtré sur un tamis. Après la filtration, le pancréas est lavé à nouveau puis le surnageant est retiré en séchant au maximum le culot. Les îlots de Langerhans sont ensuite purifiés à l'aide d'un gradient de densité consistant en 3 couches successives de 1100, 1080 et 1060 mg/mL à partir d'une première couche d'Histopaque[®] 1119 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Les îlots sont collectés à l'interface des gradients 1080 et 1100 puis lavés dans du HBSS froid (Biowest, Riverside, MO) avant d'être piqués manuellement sous le microscope. Les îlots sont cultivés pendant 24h dans du milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 2 mM de L-glutamine, 1 mM de sodium pyruvate, 0,1 mM d'acides aminés non essentiels, 10 mM d'HEPES, 100 UI/MI de pénicilline et 100µg de streptomycine (tous provenant de Corning, NY, USA).

2. Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose :

Suite à l'isolement des îlots de Langerhans, ces derniers ont été mis en culture dans un milieu complet supplémenté ou non avec 50 ng/mL d'IL-34 (R&D systems, Minneapolis, MN), 50 ng/mL de TNF- α ou 25 ng/mL IL-1 β (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany). Pour mesurer la sécrétion d'insuline, 20 îlots ont été ensemencés dans des tubes Eppendorf 1,5 dans 100 μ L de tampon Krebs-Ringer supplémenté avec de l'HEPES et 0,5% de BSA FFA et 2,8 mM de glucose pendant 1h à 37°C sous agitation. Après 1h, 50 μ L de milieu est retiré et remplacé par 50 μ L de tampon Krebs-Ringer contenant 2,8mM de glucose. Après 1h, 50 μ L de milieu est récupéré pour être stocké à -20°C et 50 μ L de tampon Krebs Ringer contenant 30,6 mM de glucose est ajouté. Les îlots cultivés en présence des cytokines ont été stimulés avec les mêmes concentrations que celles utilisées pour la culture. Après 1h, le milieu est de nouveau récupéré et stocké à -20°C. Les îlots sont ensuite lysés dans une solution d'acide alcool puis stockés à -20°C. Après décongélation et avant de doser l'insuline totale des îlots lysés, 10 μ L de solution de neutralisation est ajoutée. L'insuline libérée dans le milieu et l'insuline totale ont été mesurées en utilisant un kit commercial (Mercodia, Uppsala, Sweden). Les résultats sont exprimés en index de stimulation d'insuline calculé comme le ratio entre les niveaux d'insuline sécrétés en présence de 16,7 mM et de 2,8 mM de glucose

3. Isolement des cellules immunitaires et cytométrie en flux

Les souris ont été anesthésiées par association de xylazine (0,05 mg/mL, Bayer Sante Division Santé Animale, La Garenne-Colombe, France) et de kétamine (1 mg/mL, Merial SAS, Lyon, France) en intrapéritonéale puis sacrifiées par dislocation cervicale. Les rates et les ganglions ont été isolés et broyés afin de récupérer les splénocytes après la lyse des globules rouges. Les foies ont été perfusés avec du PBS et digérés enzymatiquement à l'aide du GentleMacs Octo Dissociator with heater (Miltenyi biotec, Bergish Gladbach, Allemagne). Après la lyse des globules rouges, les cellules immunitaires ont été purifiées par centrifugation avec un gradient de densité de Percoll (35-70%) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Les splénocytes et les cellules immunitaires du foie et des ganglions ont été suspendus dans du tampon FACS (1% BSA, 0.01% NaN₃ dans du PBS) et incubés pendant 10 min avec les anticorps listés dans le tableau 2 en fonction des panels. Les cellules ont ensuite été fixées et perméabilisées (Foxp3/Transcription Factor Staining buffer set; Invitrogen, Waltham, MA) permettant les marquages intracellulaires. Les données ont été acquises en utilisant le cytomètre Cytoflex (Beckman-Coulter, Brea, CA) et analysées en utilisant le logiciel FlowJo (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ).

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage des différentes populations immunitaires.

Antibody	Provider	Reference
BV421-labeled rat anti-CD49b	BD Bioscience	Cat #563063
Viogreen-labeled anti-CD45	Miltenyi biotec	Cat #130-102-412
FITC-labeled rat anti-CD8 α	BD Bioscience	Cat #553031
PerCP/Cyanine 5.5-labeled anti-CD3 ϵ	Biolegend	Cat #100327
PE-labeled anti-CD44	eBioscience	Cat #12-0441-83
PE/Cyanine 7-labeled anti-CD19	Biolegend	Cat #115519
APC-labeled anti-CD62L	Biolegend	Cat #400512
BV421-labeled anti-CD11c	BD Bioscience	Cat #565452
FITC-labeled anti-I-Ab	BD Bioscience	Cat #553551
PE-labeled anti-CD11b	eBioscience	Cat #12-0112-81
PE/Cyanine 7-labeled anti-Ly6c	Biolegend	Cat #128017
APC-labeled anti-Ly6g	BD Bioscience	Cat #560599
V450-labeled anti-Ly6c	BD Bioscience	Cat #560594
PE-labeled anti-F4/80	Invitrogen	Cat #MF48004-3
Viogreen-labeled anti-ouse CD68	Miltenyi biotec	Cat #130-102-922
FITC-labeled anti-CD11c	Biolegend	Cat #117306
APC-labeled anti-CD11b	Miltenyi biotec	Cat #130-091-241
APC/Cyanine 7-labeled anti-CD45	Miltenyi biotec	Cat #130-102-412
PerCP/Cyanine 5.5-labeled anti-I-A/I-E	BD Bioscience	Cat #562363
PE-labeled anti-CD3e	BD Bioscience	Cat #553064

III. Procédures expérimentales in vitro :

1. Analyse tissulaire :

Les analyses tissulaires sur le pancréas humain ont été réalisées par la plateforme MicroPICell (Micromorph, Nantes, France). Les immunomarquages ont été réalisés sur des coupes pancréatiques commerciales (T2234188 and T2236188D ; CliniSciences, Nanterre, France). Les coupes tissulaires ont été incubées avec un anti-IL-34, un anti-M-CSF (Abcam, Cambridge, UK), un anti-glucagon, un anti-somatostatine et un anti-insuline (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Les noyaux cellulaires ont été marqués avec du 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). La fluorescence a été visualisée à l'aide d'un microscope inversé automatisé Axio Observer et les images ont été analysées à l'aide du logiciel Zen (Zeiss, Göttingen, Germany).

2. ELISA :

Les taux d'IL-34 dans le plasma murin ont été quantifiés à l'aide d'un ELISA commercial suivant les recommandations du fournisseur (BioLegend, San Diego, CA). Les niveaux d'insuline ont été quantifiés d'une part dans le sérum murin (Merck, Rahway, NJ et Mercodia, Uppsala, Sweden) et d'autre part dans les surnageants de culture (Mercodia, Uppsala, Sweden).

3. Etude de l'expression génique :

a. Extraction d'ARN :

L'extraction des ARN totaux tissulaires a été réalisée en utilisant le réactif TRIZOL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Les ARN sont extraits par ajout de chloroforme puis transférés sur une colonne de silice afin de les purifier. Les ARN des îlots de Langerhans ont été lysés dans 350 μ L de tampon RLT provenant du micro-kit RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Germany). L'extraction de l'ARN est ensuite réalisée suivant le protocole du même réactif d'extraction.

b. Rétrotranscription et génération des ADNc :

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 500ng d'ARN total, d'1 μ g de randoms hexamers (0,5 μ g/mL) dans un volume final de 10 μ L d'eau RNase/DNase free. La solution est dénaturée pendant 5 min à 70°C avant d'être refroidie à 4°C pour bloquer la renaturation. La rétrotranscription est réalisée en ajoutant 10 μ L d'un mélange contenant 1 μ L d'eau, 4 μ L de tampon 5X, 2 μ L de DTT à 0,1 mol/L, 1 μ L de dNTP à 10 mmol/L, 1 μ L de RNaseout à 400 U/L, 1 μ L de SuperScript II (Invitrogen). La solution est ajoutée aux ARNs puis incubée successivement 10 min à 25°C, 1h à 42°C et 10 min à 70°C. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C avant d'être dilués pour la qPCR.

c. PCR quantitative (qPCR) :

L'expression de l'ARNm a été analysée par qPCR. La quantification relative a été calculée en utilisant la méthode développée par Pfaffl (facteur d'induction = $2^{-\Delta\Delta CT}$) reprise et adaptée par Vandesompele pour déterminer une expression relative normalisée. Elle permet de traduire les Cq d'une échelle linéaire en échelle logarithmique en utilisant le calcul $Q=2^{(\Delta Ct)}$ afin de déterminer la quantité relative pour un gène donné avec $\Delta CT = Cq_{\text{min}} - Cq_{\text{gène}}$ du gène à quantifier – Cq de l'échantillon au sein de la cohorte pour ce même gène. Quand $Cq_{\text{min}} = Cq_{\text{gène}}$, le plus petit au sein de la cohorte pour un gène donné, on obtient alors $2^{(0)} = 1$. Les Cq pour un gène donné sont ainsi échelonnés en échelle logarithmique avec l'échantillon ayant la plus forte expression au sein d'une cohorte un niveau à 1.

L'expression relative déterminée pour un gène donné ou pour un ensemble de gènes donnés avec ce calcul est ensuite normalisée avec l'expression relative déterminée pour un gène de ménage ou avec la moyenne géométrique de l'expression de plusieurs gènes de ménage dont l'expression a été précédemment testée pour ne pas être modifiée au cours de l'étude. On a alors $Q_{norm} \text{ gène(s) d'intérêt} = Q \text{ gène(s) d'intérêt} / Q \text{ gènes de ménage}$ ou $Q_{norm} \text{ gène(s) d'intérêt} = G \text{ gène(s) d'intérêt} / \text{moyenne géométrique } Q \text{ gènes de ménage}$. Les gènes B2M, ACTB, TBP and HPRT1 comme référence en fonction du tissu. Les résultats sont exprimés en termes d'expression relative de l'ARNm.

Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour l'analyse de l'expression génique.

Gènes		Séquence d'oligonucléotide sens	Séquence d'oligonucléotide antisens
B2M Murine		CTCGCTCGGTGACCC	CGGGTGGAAGTGTGTTACG
TBP Murine		CTATCACTCTGCCACACC	TGTTCTTCACTCTTGGCTCC
ACTB Murine		GCTGTATCCCCTCCATCG	GGTGAGCAGCACAGGG
HPRT1 Murine		CGGGGGACATAAAAAGTTATTGG	TTCGAGAGGTCCTTTTCACC
IL-34	Murine	CCAACATCACAAGGCTGC	TCTCCAGCAATGTCTGAACC
	Humain	GTGCTTAGGCCTCTGTGGAC	GCCAAGGAAGATCCCAAGATA
M-CSF	Murine	GATCCCTGAGTCTGTCTTCC	CACCTGTCTGTCTCATCC
	Humain	GAAAGATCCAGTGTGCTACC	CTCATAGAAAGTTCGGACGC
CD115	Murine	ACTGGTGAAGGATGGATACC	GCAGGTTAGCATAGTCTGG
	Humain	TGCAAGGTTTTAACTGGACC	ATATGACGCTTACCTCTGGG
CD11c Murine		TGTGAAGTTGCTTCTCCCG	GCAGATGTGGTCAGCTCC
IL-6 Murine		TCTGCAAGAGACTTCCATCC	CCACGATTTCCAGAGAACA
TNF α Murine		TGTACCTTGCTACTCCAGG	AGGTATATGGGCTCATACCAGG
IL-1 β Murine		AAAGCTCTCCACCTCAATGG	GCCGTCTTTCATTACACAGG
CCL2 Murine		CCTGCTGCTACTCATTACCC	TGTATGTCTGGACCCATTCC
F4/80 Murine		CGTGTGTTGGTGGCACTGTGA	CCACATCAGTGTCCAGGAGAC
GLUT4 Murine		CCTGTAACCTCATTGTCCGGC	TCTAAAAGGGAAGGTGTCCG
Pdx1 Murine		ATTGTGCGGTGACCTCGGGC	GATGCTGGAGGGCTGTGGCG
Mafa Murine		TCCGACTGAAACAGAAGCGG	CTCTGGAGCTGGCACTTCTC
glucagon Murine		AGGCCGAGGAAGGCGAGACT	GGAGCCATCAGCGTGCTGC
Ins1 Murine		GCCAAACAGCAAAGTCCAGG	GTTGAAACAATGACCTGCTTGC
Ins2 Murine		CAGCAAGCAGGAAGCCTATCT	CAGGTGGGAACCACAAAGGT

IV. Analyses statistiques :

Les tests Mann-Whitney, Krustall-Wallis, Wilcoxon ANOVA et de Sidak ont été réalisés en utilisant le logiciel Prism Graph-Pad version 9.0 (Graph-Pad, Boston, MA). Les données sont exprimées en moyennes \pm SEM. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à des valeurs $p < 0,05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Résultats

Résultats

Dans cette étude, après avoir identifié une expression constitutive d'IL-34 dans les îlots de Langerhans humains et murins, par des analyses de co-marquage entre l'IL-34 et les hormones produites dans les îlots, nous avons observé une colocalisation par immunofluorescence entre l'IL-34 et l'insuline suggérant une production de l'IL-34 par les cellules β dans les îlots de Langerhans.

Suite à cette mise en évidence de l'expression d'IL-34 dans les îlots de Langerhans, afin de comprendre le rôle de l'IL-34 dans le pancréas, nous avons généré un modèle de souris dans lequel les cellules β des îlots de Langerhans sont invalidées pour le gène de *Il34*. Ces souris ont été obtenues par croisement de souris transmises par l'équipe de Marco Colona et chez lesquelles le gène de *Il34* est flanqué de deux séquences Lox (*IL-34^{ff}*), avec des souris pour lesquelles l'expression de la recombinaise cre est dépendante du promoteur Pdx1 (*Pdx-Cre*). Les souris obtenues par ce croisement nommées *IL-34^{ΔPdx}* sont invalidées pour le gène de *Il34* dans les cellules β uniquement.

L'étude des souris *IL-34^{ΔPdx}* nous a permis d'analyser les conséquences de l'absence d'expression de l'IL-34 pancréatique. Alors que la concentration plasmatique de l'IL-34 n'est pas différente entre les souris *IL-34^{ΔPdx}* et leurs contrôles (*IL-34^{ff}*), les souris *IL-34^{ΔPdx}* présentent pourtant une tolérance au glucose diminuée en vieillissant comparativement aux souris contrôles indiquant un rôle local de l'IL-34 sur l'homéostasie du glucose. En parallèle, une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les îlots de Langerhans semble être plus prononcée chez les souris *IL-34^{ΔPdx}* âgées. Les conséquences de cette surexpression des cytokines pro-inflammatoires en absence d'IL-34 sur les fonctionnalités des îlots de Langerhans ont été analysées *in vitro*. Les îlots de Langerhans de souris jeunes et âgées ont été stimulés par du glucose en présence ou en absence de cytokines pro-inflammatoires et avec ou sans IL-34 et la sécrétion d'insuline a ensuite été quantifiée par ELISA. Les résultats *in vitro* confirment une action directe des cytokines pro-inflammatoires sur la sécrétion d'insuline qui est diminuée comparativement aux îlots stimulés en absence de cytokines. L'ajout d'IL-34 inhibe les effets des cytokines pro-inflammatoires et restaure un ratio de sécrétion d'insuline suggérant un rôle prépondérant de l'IL-34 dans l'inflammation locale. Les îlots pancréatiques issus de souris *IL-34^{ΔPdx}* âgées répondent plus faiblement en termes de quantité d'insuline sécrétée par rapport à ceux des souris *IL-34^{ff}* du même âge confirmant que l'absence d'IL-34 dans les îlots altère la fonctionnalité des cellules β . Ces résultats montrent un rôle régulateur de l'IL-34 au niveau local sur l'action des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées de façon plus prononcée au cours du vieillissement suite à une stimulation chronique du système immunitaire, inflammation chronique appelée « inflammaging ». Cet état de fait caractérisé comme de l'inflammation à bas bruit est également associé à des dysfonctions métaboliques.

Suite à ces premiers résultats obtenus chez les souris IL-34^{ΔPdx} en condition physiologique de vieillissement, les souris ont été mises sous un régime riche en graisse et en sucre (HFD) afin d'obtenir un modèle d'inflammation chronique de bas grade par l'intermédiaire d'une situation d'obésité. Les souris IL-34^{ΔPdx} après 16 semaines de régime HFD présentent une tolérance au glucose diminuée par rapport aux souris IL-34^{ff} sous le même régime alimentaire. Cette altération de la régulation glycémique est similaire à celle observée chez les souris IL-34^{ΔPdx} âgées et est associée à une activité des cellules β et une inflammation locale significativement plus importante. Ces résultats obtenus chez les souris invalidées pour le gène de *Il34* dans les cellules β confirment le rôle immunorégulateur de l'IL-34 dans les îlots de Langerhans.

Parallèlement, les souris contrôles sous régime HFD présentent une augmentation significative de l'IL-34 dans les îlots de Langerhans vis-à-vis des souris contrôles sous régime conventionnel. Cette augmentation d'expression de la cytokine est retrouvée dans les îlots de Langerhans de patients diabétiques, avec une augmentation d'expression intermédiaire chez les patients obèses. En conclusion, l'IL-34 module l'inflammation dans les îlots de Langerhans et participe à la maintenance de l'homéostasie du glucose.

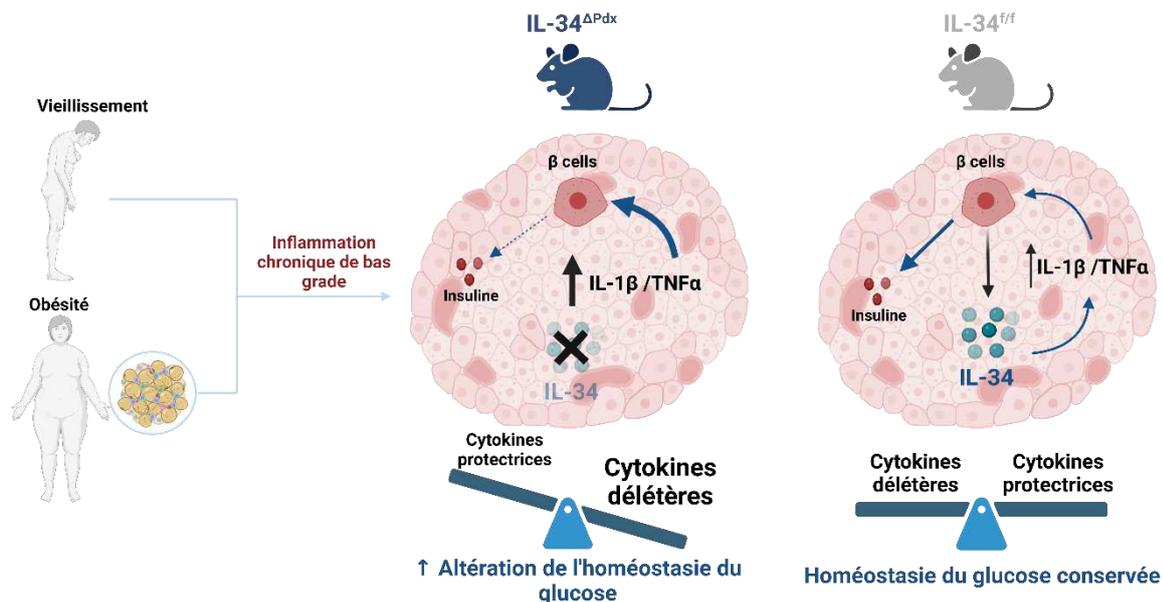


Figure 19 : Schéma bilan de l'étude du rôle de l'IL-34 dans la physiologie du pancréas. En condition d'inflammation induite par le vieillissement ou l'obésité, l'IL-34 module les effets des cytokines pro-inflammatoires sur la sécrétion d'insuline. L'inhibition de l'expression d'IL-34 favorise l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires qui impacte la sécrétion d'insuline. La signalisation des cytokines joue un rôle majeur dans le microenvironnement des îlots de Langerhans et un déséquilibre affecte le métabolisme du glucose.

IL-34 is expressed in the pancreas and regulates local inflammation.

Chloé M Delépine¹, Emilie Courty², Laurence Preisser¹, Raffaella Soleti¹, Laetitia Basset¹, Laure Rolland², Marine Monnier¹, Gianni Pasquetti³, Simon Blanchard¹, Pascale Pignon¹, Nathalie Merillon^{1,4}, Julie Kerr-Conte³, Charline Miot^{1,4}, Dominique Couez¹, Aline Schmidt-Tanguy^{1,5}, Pascale Jeannin^{1,4}, Jean-Sébastien Annicotte², Yves Delneste^{1,4}, Celine Beauvillain^{1,4,*}

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

2 Univ Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167-RID-AGE-Facteurs de Risque et Déterminants Moléculaires des Maladies liées au Vieillissement, F-59000 Lille, France

3 Univ Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur Lille, U1190, EGID, F-59000 Lille, France

4 Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, CHU Angers, F-49000 Angers, France

5 Service des Maladies du Sang, CHU Angers, F-49000 Angers, France

* Correspondance :

Celine Beauvillain

CHU Angers, Institut de Biologie en Santé

CRCI2NA, UMR Inserm 1307 – CNRS 6075 – Université d'Angers

4 rue Larrey, F-49000 Angers

celine.beauvillain@univ-angers.fr

ORCID ID: 0000-0002-6987-3120

Keywords: IL-34, pancreas, insulin, metaflammation, inflammaging.

Summary

This study demonstrates that IL-34 is constitutively expressed in the pancreas and controls inflammaging and metaflammation, acting as a regulator of T2D.

Short running titles

IL-34 regulates pancreatic inflammation.

Abstract

IL-34 is a ligand of CD115 that controls Langerhans cells and microglia homeostasis and acts as regulatory cytokine. Here, we describe an unexpected role for IL-34 in metabolic homeostasis. We highlighted IL-34 is constitutively expressed by human β -cell and mouse islets of Langerhans. β -cell specific genetic invalidation of *Il34* in mice (IL-34 ^{Δ Pdx}) impaired glucose tolerance associated with increased inflammation in islets of Langerhans during aging. This phenotype was exacerbated when IL-34 ^{Δ Pdx} mice were subjected to a high-fat diet, suggesting a role for IL-34 in controlling local inflammation. Accordingly, in the presence of pro-inflammatory cytokines, *ex vivo* murine islets of Langerhans exhibited a decreased insulin synthesis, which was restored in the presence of IL-34. Finally, we observed that the levels of IL-34 were elevated in islets of Langerhans from type 2 diabetic donors. Altogether, our results identify IL-34 as a major regulator of pancreas inflammation.

Introduction

A complex interplay between the immune system and metabolism maintains a delicate balance to protect against severe chronic diseases such as obesity and diabetes (Lee and Olefsky, 2021; Rohm et al., 2022). Obesity is the most common leading cause of insulin resistance (IR) (Ahmed et al., 2021). When hyperinsulinemia cannot longer compensate IR, β -cell dysfunction appears, leading to type 2 diabetes (T2D) (Lee and Olefsky, 2021; Ruze et al., 2023, p. 2). In this context, insulin-sensitive organs, such as liver, adipose tissues and muscles, are subjected to chronic low-grade inflammation, which sequentially affects islets of Langerhans and the insulin-producing β -cells (Lee and Olefsky, 2021). One of the hallmarks of T2D-related chronic inflammation is the accumulation of macrophages ($M\phi$) in adipose tissues and pancreas (Caslin et al., 2020; Cucak et al., 2014; Ehses et al., 2007; Weisberg et al., 2003). Infiltrating $M\phi$ exhibit a M1-type inflammatory phenotype, as illustrated by the production of IL-1 β and TNF- α (Cucak et al., 2014; Hill et al., 2018; Lumeng et al., 2007; Ying et al., 2019). In addition, expansion of islet-resident immune cells affects β -cell proliferation and function in obesity (Ying et al., 2020). T2D is therefore defined as a chronic, low-grade inflammatory disease whose mechanisms are not fully understood.

Interleukin 34 (IL-34) was identified as the second ligand of the M-CSF receptor CD115 (Lin et al., 2008). Mostly produced by keratinocytes and neurons (Wang et al., 2012), IL-34 is a master regulator of myeloid cell survival and controls Langerhans cells and microglia homeostasis (Greter et al., 2012). Monocyte-derived macrophages generated *in vitro* in the presence of IL-34 exhibit a regulatory IL-10^{hi}/IL-12^{lo} phenotype (Foucher et al., 2013) and pro-fibrotic properties (Preisser et al., 2014). The immunoregulatory properties of IL-34 have been described in different pathophysiological conditions, thanks to its capacity to control the expression of inflammatory cytokines or to promote regulatory T-cell functions (Foucher et al., 2015; Guillonnet et al., 2017; Wang et al., 2017).

As other regulatory mediators, studies have reported that IL-34 is overexpressed in chronic inflammatory and metabolic disorders such as obesity and gestational diabetes (Ciccia et al., 2013; Franzè et al., 2015; Moon et al., 2013; Wang et al., 2016) Chang et al., 2014; Piao et al., 2019). IL-34 expression is increased in an adipogenic context (Chang et al., 2014) and meta-analyses identified *IL34* in risk *loci* associated with T2D (Below et al., 2011; Zorena et al., 2016). Accordingly, circulating levels of IL-34 are increased in serum samples of obese patients and of women with gestational diabetes (Chang et al., 2014; Piao et al., 2019).

Collectively, these data suggest that IL-34 may be involved in the inflammation process associated with a dysregulated metabolism as observed in T2D. However, to date, the expression and role of IL-34 in β -cell function have been poorly studied. Whether IL-34 has a beneficial or a deleterious role in these conditions remains to be explored. The aim of this study was to evaluate the expression and role of IL-34 in pancreatic β -cells. To investigate its potential role in β -cell function, we generated mice deficient for IL-34 in pancreatic β -cells by crossing IL-34^{fl/fl} mice with mice expressing Cre recombinase under the β -cell specific *Pdx1* promoter (IL-34^{APdx} mice). Our results reveal that the loss of IL-34 expression in β -cells affected glucose homeostasis during aging, a process associating with an exacerbated low-grade inflammation in islets of Langerhans. *Il34* deficiency is also detrimental in the context of low-grade inflammation induced by a high fat regimen. Altogether, these results identify an unexpected modulatory role of IL-34 in the local environment of islets of Langerhans.

Methods

Animals.

Pdx-Cre transgenic mice (JAX #014647; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) (Hingorani et al., 2003) express the Cre recombinase under the control of the mouse *Pdx1* promoter. IL-34^{fl/fl} transgenic mice, carrying a conditional *Il34* allele in which exons 2-5 are flanked by *loxP* sites (Wang et al., 2012), were provided by Pr Marco Colonna (Washington University, St Louis, MO). To generate pancreas-specific mutant mice, Pdx-Cre mice were mated with IL-34^{fl/fl} mice to generate a F1 heterozygous generation. F1 Pdx-Cre^{+/-} IL-34^{fl/+} males were then crossed with IL-34^{fl/fl} females to generate mice deficient for IL-34 in pancreatic β cells (IL-34 ^{Δ Pdx}). Littermates were used as controls. Mice were genotyped by PCR using the following oligonucleotides: For Pdx-Cre, forward Cre primer: GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC, reverse Cre primer: GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT, generating a 100 bp product; internal positive control: forward control primer: CTAGGCCACAGAATTGAAAGATC, reverse control primer: GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC, generating a 324 bp product. For IL-34^{fl/fl}, forward primer: CCCTGGTCGGCTTTGCATGT, reverse primer: CCATGGTCAGAGTCCCCAGG, generating a 468 or a 570 bp product, corresponding to wild type IL-34 or to IL-34^{fl/fl}, respectively. Animals were housed under specific pathogen-free conditions. Experiments were performed on females and were approved and conducted in accordance with the institutional ethics committee of Region des Pays de la Loire and authorized by the Research French Ministry (agreements APAFIS#8256-2016121823456077/APAFIS #37469-2022052417088984 v3).

Tissue analysis.

Immunostaining was performed using commercial pancreatic sections (T2234188 and T2236188D; CliniSciences, Nanterre, France). Tissue sections were incubated with anti-human IL-34, anti-human M-CSF (Abcam, Cambridge, UK), anti-glucagon, anti-somatostatin and anti-insulin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Fluorescence was visualized using an automated Axio Observer inverted fluorescence microscope and images analyzed using the ZEN software (Zeiss, Göttingen, Germany).

ELISA.

Murine IL-34 in plasma samples was quantified by commercial assays according to the manufacturer recommendations (BioLegend, San Diego, CA). Insulin was quantified in serum (Merck, Rahway, NJ) and culture supernatants (Mercodia, Uppsala, Sweden) according to manufacturer instructions.

Glucose tolerance and insulin sensitivity tests.

After a 5 hours starvation, mice were intraperitoneally injected with 2 g/kg body weight glucose (Biosolve, Dieuze, France) for glucose tolerance test (GTT) or with 0.5 IU/kg insulin (Sigma-Aldrich) for insulin tolerance test (ITT). Capillary blood glucose levels were measured at 0, 15, 30, 45, 60 and 120 min after glucose administration by using a glucometer (Accu-check; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Pancreatic islet isolation.

Mice were anesthetized and euthanized before pancreas perfusion with type V collagenase (Sigma-Aldrich). Once completely inflated, the pancreas was incubated at 37°C for 20 min. After washings and filtrations, islets of Langerhans were purified by centrifugation using a density gradient consisting in three layers of 1100, 1080 and 1060 g/mL Histopaque® 1119 (Sigma-Aldrich). Islets of Langerhans were collected at the 1080-1100 interfaces and washed in iced cold HBSS (Biowest, Riverside, MO) before hand-picked under microscope. Islets of Langerhans were cultured for 24 hours in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin and 100 µg streptomycin (all from Corning, NY, USA) (complete culture medium).

Human islets of Langerhans were used for research only if research consent was obtained as specified by U1190's authorization from the Agence de la BioMedecine France / French procurement agency.

Glucose-stimulated insulin secretion.

Islets of Langerhans from IL-34^{ΔPdx1} and control mice were cultured for 24 hours in complete culture medium, in the absence or presence of 50 ng/mL IL-34 (R&D systems, Minneapolis, MN), 50 ng/mL TNF-α or 25 ng/mL IL-1β (both from Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany). After culture, 20 islets of Langerhans were resuspended in Krebs-Ringer buffer supplemented with HEPES and 0,5% free fatty acid BSA and exposed to 2.8 mM or 16.7 mM glucose, in the absence or presence of the cytokines used at the same concentrations. Insulin released in the presence of glucose and total insulin were measured using a commercial kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Results were expressed as an insulin stimulation index calculated as the ratio between the levels of insulin secreted in the presence of 16.7 mM and in the presence of 2.8 mM glucose.

Quantitative real-time PCR.

RNA was extracted from mouse and human tissues using TRIZOL reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) or the RNeasy Plus micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed using the Superscript II reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific). The expression of mRNA was analysed by qPCR. Relative quantification was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Vandesompele et al., 2002) using B2M, ACTB, TBP and HPRT1 as references. Results are expressed as relative mRNA expression. Primer sequences are listed in *Supplementary Table 2*.

High fat diet.

6-7 weeks-old IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{fl/fl} female mice were randomly allocated to 2 groups of 10 mice which received a standard diet (SAFE D04: 18.1% protein, 8.4% lipids and 73.6 NFE) or a high fat diet (SAFE 260HF: 14.4% protein, 58.6% lipids and 27% NFE) (both from SAFE, Rotterdam, The Netherlands). Blood glucose was measured in plasma samples collected 4, 8, 12, and 16 weeks after the initiation of diet. Glucose tolerance test was performed every month during the 16 weeks of diet and insulin tolerance test was performed at month 4. After 16 weeks of diet, mice were anesthetized with ketamine/xylazine and euthanized. Tissues were harvested for analysis.

Statistical analysis.

Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, ANOVA and Sidak tests were performed using Graph-Pad Prism version 9.0 software (Graph-Pad, Boston, MA). Data are expressed as means \pm SEM. Differences were considered statistically significant at p values <0.05 (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$).

Results

Interleukin-34 is expressed in human and mouse islets of Langerhans.

We first analyzed the expression of IL-34 in pancreatic sections from healthy subjects. Results showed that IL-34 is expressed in islets of Langerhans (Fig. 1A) and interestingly, IL-34-producing cells were distinct from M-CSF-producing cells (Fig. 1A). We next determined the nature of IL-34-expressing cells by pancreatic hormones co-staining. IL-34 was found to be expressed by insulin-producing β -cells (Fig. 1B, upper panel); no or low co-expression with somatostatin and glucagon was observed (Fig. 1B, middle and lower panels). The expression of IL-34 mRNA was detected in both human (Fig. 1C) and mouse islets of Langerhans (Fig. 1D).

These results revealed that IL-34 is constitutively expressed in human and mouse islets of Langerhans.

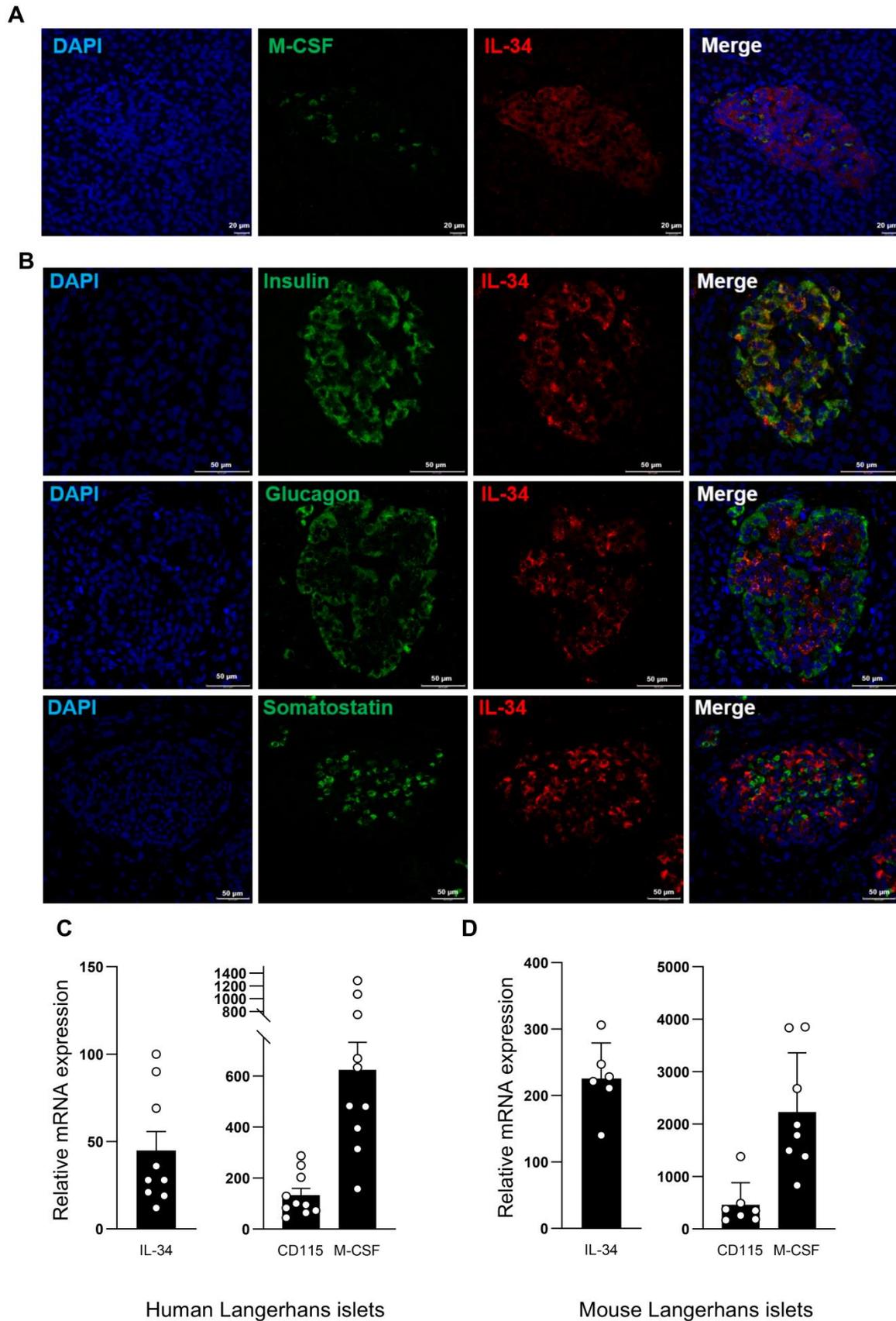


Figure 1. IL-34 expression in human and mouse pancreas. (A) IL-34 and M-CSF expression was analyzed by immunofluorescence in pancreas sections from healthy subjects. M-CSF, FITC labelling

(green); IL-34, TRITC labelling (red); nucleus, DAPI labelling (blue). Scale bar = 20 μ m. **(B)** The expression of IL-34, insulin, glucagon and somatostatin proteins was analyzed in pancreas sections from healthy subjects. Hormones, FITC labelling (green); IL-34, TRITC-labelling (red); nucleus, DAPI labelling (blue). Scale bar = 50 μ m. **(C,D)** IL-34, M-CSF and CD115 mRNA expression in human **(C)** (n=9) and murine islets of Langerhans **(D)** (n=6-8) was assessed by RT-qPCR. Results are expressed in relative mRNA levels.

Aged IL-34^{ΔPdx} mice have impaired glucose homeostasis.

To determine the role of IL-34 in the pancreas, we generated β -cell specific IL-34 deficient mice by mating Pdx-Cre mice expressing the recombinase gene under the *Pdx1* promoter with IL-34^{f/f} mice (Fig. 2A). IL-34^{f/+} offsprings and Cre-transgenic hemizygous/heterozygous mice were mated back to IL-34^{f/f} mice to generate IL-34^{ΔPdx}; IL-34^{f/f} mice not expressing the *cre* transgene were used as littermate controls (Fig. 2A). Based on the data from the literature reporting that IL-34 is overexpressed in gestational diabetes (Piao et al., 2019) and that *IL34* SNPs are predictive of T2D in women (Below et al., 2011), we decided to focus on female mice in our study. Mice were divided in two groups according to their age (young mice from 7 to 24 weeks and aged mice from 25 to 45 weeks). RT-qPCR analyses on islets of Langerhans confirmed that the expression of IL-34 mRNA was strongly reduced in both young and aged IL-34^{ΔPdx} mice (Fig. 2B). No compensatory expression of M-CSF was observed in islets of Langerhans from IL-34^{ΔPdx} mice (Supplemental Fig. S1A). The expression of IL-34 was not affected in the brain of IL-34^{ΔPdx} mice (Supplemental Fig. S1B) and the circulating levels of IL-34 were equivalent in both IL-34^{ΔPdx} and control mice regardless of their age (Fig. 2C). Finally, body weight (Fig. 2D) and immune cell frequencies in lymph nodes, spleen and liver (Supplemental Fig. S1C-E) were similar during aging in IL-34^{ΔPdx} and control mice.

Pancreas controls glucose homeostasis and contributes to metabolic diseases occurring in the course of aging (De Tata, 2014). Although blood glucose levels were similar in IL-34^{ΔPdx} and control mice (Fig. 2E), glucose tolerance was altered in aged IL-34^{ΔPdx} mice compared to control mice (Fig. 2F), suggesting that glucose homeostasis was altered in the absence of IL-34 in pancreatic β -cells during aging. Such difference was not observed when comparing 7-24 weeks old mice (Fig. 2G). Insulin sensitivity assessed through insulin tolerance test (ITT) revealed that before 25 weeks of age, IL-34^{ΔPdx} mice had improved insulin sensitivity (Fig. 2H) which was normalized in older IL-34^{ΔPdx} mice (Fig. 2I).

Fasting insulin levels tended to be higher in young IL-34^{ΔPdx} mice compared to IL-34^{f/f} mice, confirming the gradual onset of impaired glucose tolerance with aging (Fig. 2J).

Altogether, these results evidence metabolic changes in glucose and insulin regulation that occurs in IL-34^{ΔPdx} mice as they aged.

expression was determined by RT-qPCR in young and aged IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice (n= 7-12 per group). Results are expressed as relative mRNA expression. (C) Plasma IL-34 levels were determined at the indicated times in IL-34^{ΔPdx} and control mice. (D) Weight of IL-34^{ΔPdx} and control mice (n=10). Results are expressed as the difference of weight at the indicated time compared to week 7 (Δ weight). (E) Fasting glucose levels were determined in IL-34^{ΔPdx} and control mice (n=7) at the indicated times. (F-G) Blood glucose intake was measured in IL-34^{ΔPdx1} (n=19-35) and IL-34^{ff} mice (n=20-34) in 25-45 weeks (F) and 7-24 weeks old mice (G); area under the curve (AUC) value (right) are presented. (H-I) Insulin tolerance test was performed in 7-24 (H) and 25-45 weeks old (I) IL-34^{ΔPdx1} (n= 34) and IL-34^{ff} female mice (n=30); area under the curve (AUC) value are presented. (J) Fasting insulin was quantified in young and aged IL-34^{ΔPdx1} (n=5) and IL-34^{ff} mice (n=8). (K) Insulin was quantified 15 and 30 min after glucose injection. Results are expressed as a ratio between insulin levels at 30 min compared to 15 min (mean \pm SEM, n=3-6). (B-K) Statistical analysis was performed using mixed-effect model, Sidak test, Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001).

Islets of Langerhans of IL-34^{ΔPdx} mice exhibit local inflammation which associates with impaired insulin secretion.

Based on the observation that IL-34^{ΔPdx} mice exhibited an impaired capacity to regulate glucose as they aged, we further evaluated whether the absence of IL-34 expression by β -cells impacts the expression of pancreatic identity genes. As expected, results showed that the expression of the transcripts encoding Pdx1, Mafa and the insulin genes Ins1 and Ins2 were significantly increased in aged IL-34^{ff} mice compared to young mice (Fig. 3A). In contrast, only the expression of Ins2 mRNA was significantly increased in aged IL-34^{ΔPdx} compared to young IL-34^{ΔPdx} (Fig. 3A). Glucagon mRNA levels were increased in aged IL-34^{ΔPdx} compared to IL-34^{ff} mice (Fig. 3A).

Immunosenescence is defined as the decline of immune functions during aging. This is related to an increase of inflammatory cytokine production and immune cell recruitment within tissues, a process referred to as inflammaging (Santoro et al., 2021). As IL-34 exhibits regulatory properties, we next hypothesized that β -cell IL-34 deficiency may have impacted the local immune environment. We observed that the expression of the mRNA encoding CD115 and CD11c was increased in both aged IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice, reflecting an increase of myeloid cell infiltrate in islets of Langerhans of both genotypes (Fig. 3B). Moreover, the expression of TNF α and IL-1 β , but not of IL-6, was increased in islets of Langerhans from aged IL-34^{ΔPdx} mice (Fig. 3B). Although not significant, results showed that this increase was more pronounced in IL-34^{ΔPdx} mice compared to control mice, suggesting that β -cell specific deletion of IL-34 may modulates local immunity in the pancreas with aging.

To elucidate the respective role of inflammatory cytokines and IL-34 in pancreatic β -cell function, islets of Langerhans isolated from young and aged IL-34 Δ^{Pdx} and IL-34 ff mice were subjected to glucose stimulated insulin secretion tests (GSIS), in the absence or presence of TNF α and IL-1 β , to mimic an inflammatory environment, and with or without IL-34. Whatever their origin, islets of Langerhans were sensitive to inflammatory cytokines, as evidenced by the decrease of the insulin stimulation index (ratio of insulin secretion in high versus low glucose media) upon exposure to TNF α and IL-1 β (Fig. 3C). Interestingly, the insulin stimulation indexes were equivalent to basal conditions when islets of Langerhans from young IL-34 Δ^{Pdx} and IL-34 ff mice were exposed to TNF α and IL-1 β in the presence of IL-34. However, IL-34 did not rescue the insulin stimulation index in islets of Langerhans from aged IL-34 Δ^{Pdx} mice when exposed to TNF α and IL-1 β (Fig. 3C). Insulin content was equivalent between young and aged IL-34 Δ^{Pdx} and IL-34 ff mice (Fig. 3D).

Collectively, these data indicated that islets of Langerhans from aged mice display an inflammatory status that may be exacerbated in islets of Langerhans from β -cells IL-34-deficient mice. Moreover, IL-34 seemed to counteract the impact of inflammatory cytokines on insulin secretion.

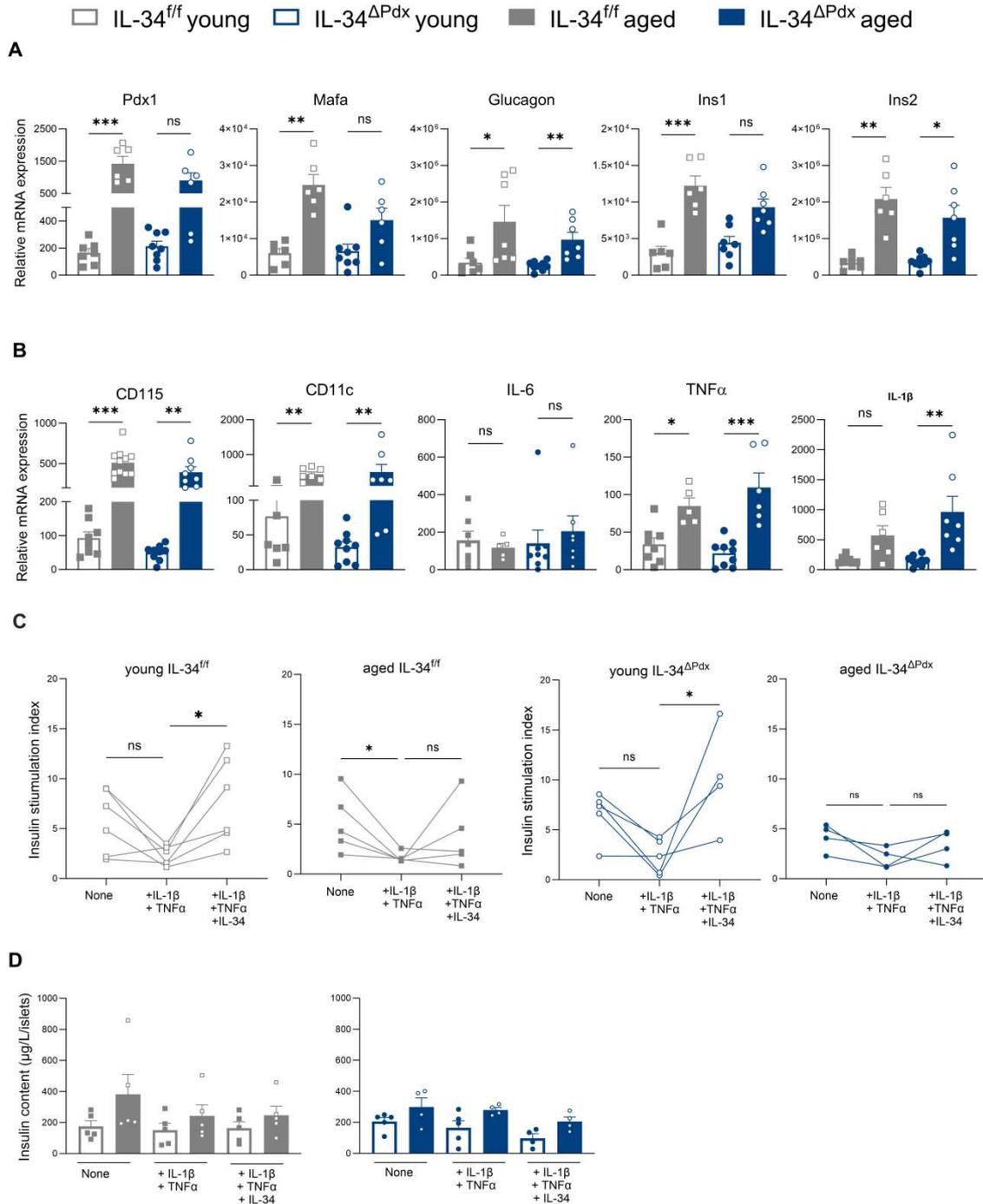


Figure 3. Aged IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice exhibit local inflammation in islets of Langerhans. (A) The expression of the transcript encoding *Pdx1*, *Mafa*, *glucagon*, *Ins1* and *Ins2* was evaluated by RT-qPCR in young and aged IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice islets of Langerhans (n= 7-9 per group). **(B)** *CD115*, *CD11c*, *IL-6*, *TNFα* and *IL-1β* mRNA expression was determined by RT-qPCR in young and aged IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice islets of Langerhans (n= 7-9 per group). **(A,B)** Results are expressed as relative mRNA expression. **(C)** Islets of Langerhans isolated from young and aged IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice (n= 4-6 per group) were stimulated with low (2.8 mM) or high (16.7 mM) concentration of glucose, in the absence (none) or presence of *TNFα* and *IL-1β*, with or without *IL-34*. Results are expressed as stimulation indexes (ratio of insulin secretion in high and low glucose). **(D)** Insulin

content was determined in islets of Langerhans from young and aged IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{fl/fl} mice (n=4-7 per group). Results are represented as mean ± SEM (Kruskal-Wallis test; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

IL-34 has an immunomodulatory role in the context of chronic low-grade inflammation associated with a metabolic stress.

Metainflammation defines a pathophysiological status characterized by chronic inflammation associated with metabolic dysfunction. This process accelerates the decline of immune functions during inflammaging (Hotamisligil, 2017). Since IL-34 regulates glucose metabolism and local inflammation during inflammaging, we wondered whether it may be protective during obesity-induced low-grade inflammation, a prototypic model of metaflammation.

IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{fl/fl} mice were fed with a chow diet (CD) or a high fat diet (HFD) and glucose metabolism was monitored during aging (Fig. 4A). Body weight gain was increased in HFD-fed compared to CD-fed mice, with a slight increase, although not significant, in IL-34^{ΔPdx} mice compared to IL-34^{fl/fl} mice (Fig. 4B). No difference in fasting insulin levels was observed between IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{fl/fl} mice fed HFD after 4 months of diet (data not shown) nevertheless fasting blood glucose levels were increased in IL-34^{ΔPdx} mice under HFD compared to IL-34^{fl/fl} mice after 4 months of diet (Fig. 4C). Analysis of inflammation parameters in adipose tissue did not show differences between IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{fl/fl} mice on HFD suggesting a local impact in pancreas (Supplemental Fig. S2D-F). Glucose tolerance was impaired in IL-34^{ΔPdx} mice fed on HFD (Fig. 4D) and circulating insulin levels tended to be lower in IL-34^{ΔPdx} versus IL-34^{fl/fl} under HFD (Supplemental Fig. S2A-B). *In vitro* insulin secreted ratios during GSIS were equivalent when using islets of Langerhans from IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{fl/fl} fed on HFD (Supplemental Fig. S2C). The assessment of insulin tolerance was similar in both genotypes under HFD (Fig. 4E).

Since glucose tolerance was altered in IL-34^{ΔPdx} mice fed on HFD, we evaluated the expression of pancreatic genes involved in glucose metabolism in islets of Langerhans. Pdx1, Mafa and Ins2 mRNA levels were significantly increased whereas glucagon and Ins1, albeit increased, did not show significant differences in IL-34^{ΔPdx} mice fed on HFD compared to IL-34^{fl/fl} mice (Fig. 4F and 4G). Interestingly, the expression of the transcripts encoding CCL2, which is involved in monocyte recruitment, and CD11c was increased in IL-34^{ΔPdx} mice on HFD compared to control mice (Fig. 4H), suggesting the presence of inflammatory macrophages in IL-34-invalidated pancreas compared to control pancreas. Moreover, under HFD, the expression of the mRNA encoding TNFα and IL-1β was increased in islets of Langerhans from IL-34^{ΔPdx} mice compared to IL-34^{fl/fl} mice (Fig. 4I). IL-6 mRNA levels were equivalent between the two groups of mice on HFD (Fig. 4I).

These data indicate that the lack of IL-34 in pancreatic β -cells modulates glucose metabolism associated with increased inflammation during diet-induced obesity.

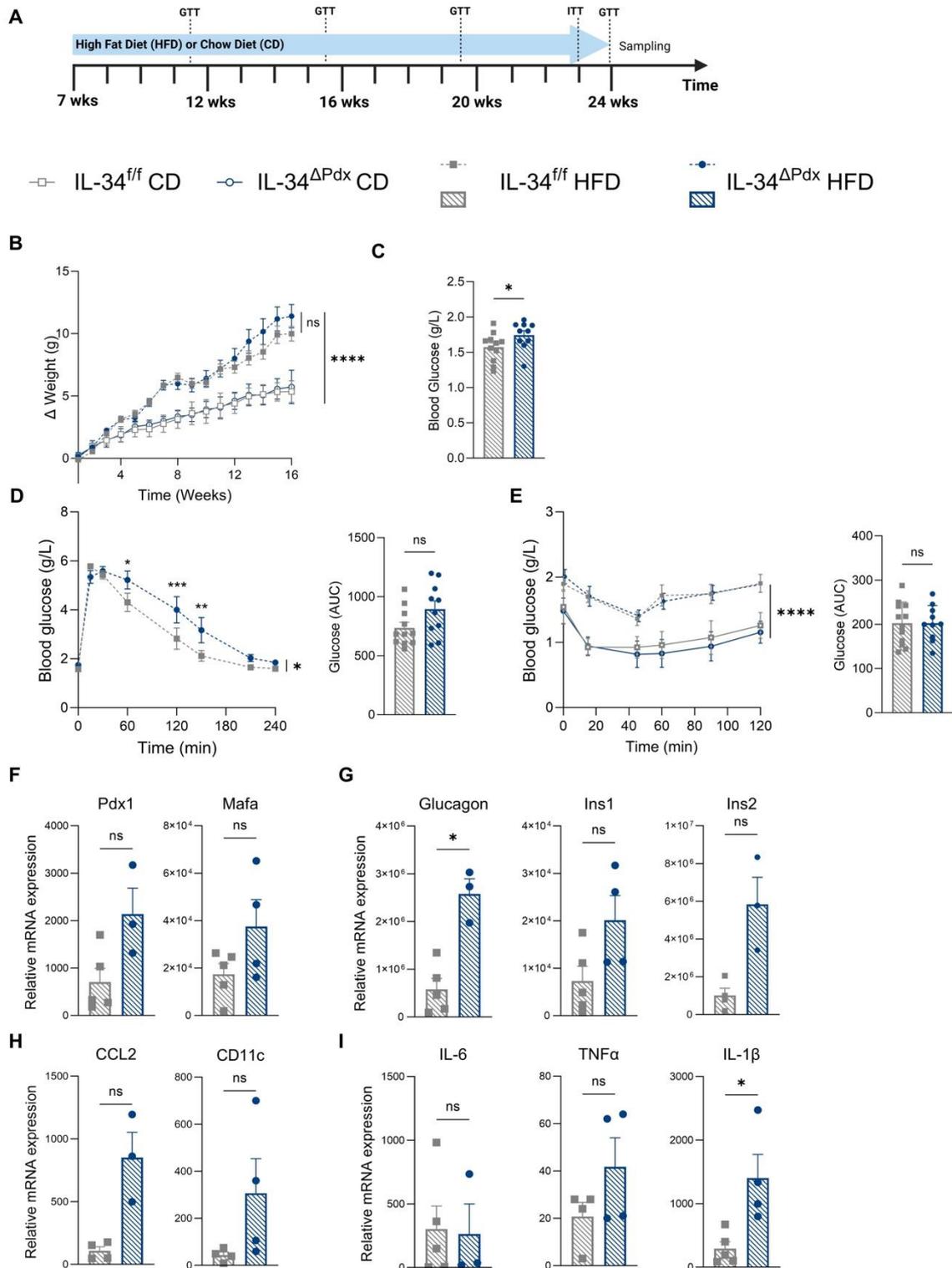


Figure 4. Immunomodulatory role of IL-34 during chronic low-grade inflammation induced by obesity. (A) Schematic representation of the protocol. (B) Weight of IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice under high fat diet (HFD) or conventional diet (CD) was determined at the indicated times ($n=10-12$ per group). Results are expressed as the weight gain compared to that at the initiation of the protocol (Δ weight). (C) Fasting blood glucose was determined in IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice ($n=10-12$ per group) 16 weeks after the initiation of the regimen. (D, E) Blood glucose quantification during glucose (D) and insulin

tolerance tests **(E)** in IL-34^{APdx} and IL-34^{fl/fl} mice at the end of diet (16 weeks) (n=10-12 per group). **(F-I)** The expression of the transcript encoding Pdx1, Mafa **(F)**, glucagon, Ins1, Ins2 **(G)**, CCL2, CD11c **(H)**, IL-6, TNF α and IL-1 β **(I)** was determined by RT-qPCR in islets of Langerhans genes isolated from IL-34^{APdx} and IL-34^{fl/fl} mice (n=3-5 per group) under HFD. Results are expressed as relative mRNA expression. **(B,C,D-I)** Results are expressed as mean \pm SEM; Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and 3-way ANOVA tests have been done (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001).

IL-34 levels are increased in islets of Langerhans of type 2 diabetic subjects.

Our results showed that IL-34 participates to the control of pancreatic inflammation, as evidenced by the exacerbated alteration of glucose metabolism in a preclinical model of diabetes. We then wondered whether the expression of IL-34 is also altered in obese subjects and T2D patients. Results showed that the expression of the transcript encoding IL-34 is significantly increased in islets of Langerhans from diabetic compared to donors (Fig. 5A). Although not significant, we observed that the levels of IL-34 mRNA were also increased in islets of Langerhans isolated from obese subjects compared to controls (Fig. 5A). A similar increase of IL-34 mRNA expression was observed in islets of Langerhans isolated from wild type mice fed HFD compared with control mice (CD) (Fig. 5B). Moreover, immunofluorescence analysis of pancreatic sections from non-diabetic and T2D subjects confirmed that the expression of IL-34 levels was increased in diabetic conditions (Fig. 5C). The expression of M-CSF was equivalent in both conditions (Fig. 5C).

These observations support a role for IL-34 in regulating inflammation associated with metabolism dysfunction in the pancreas.

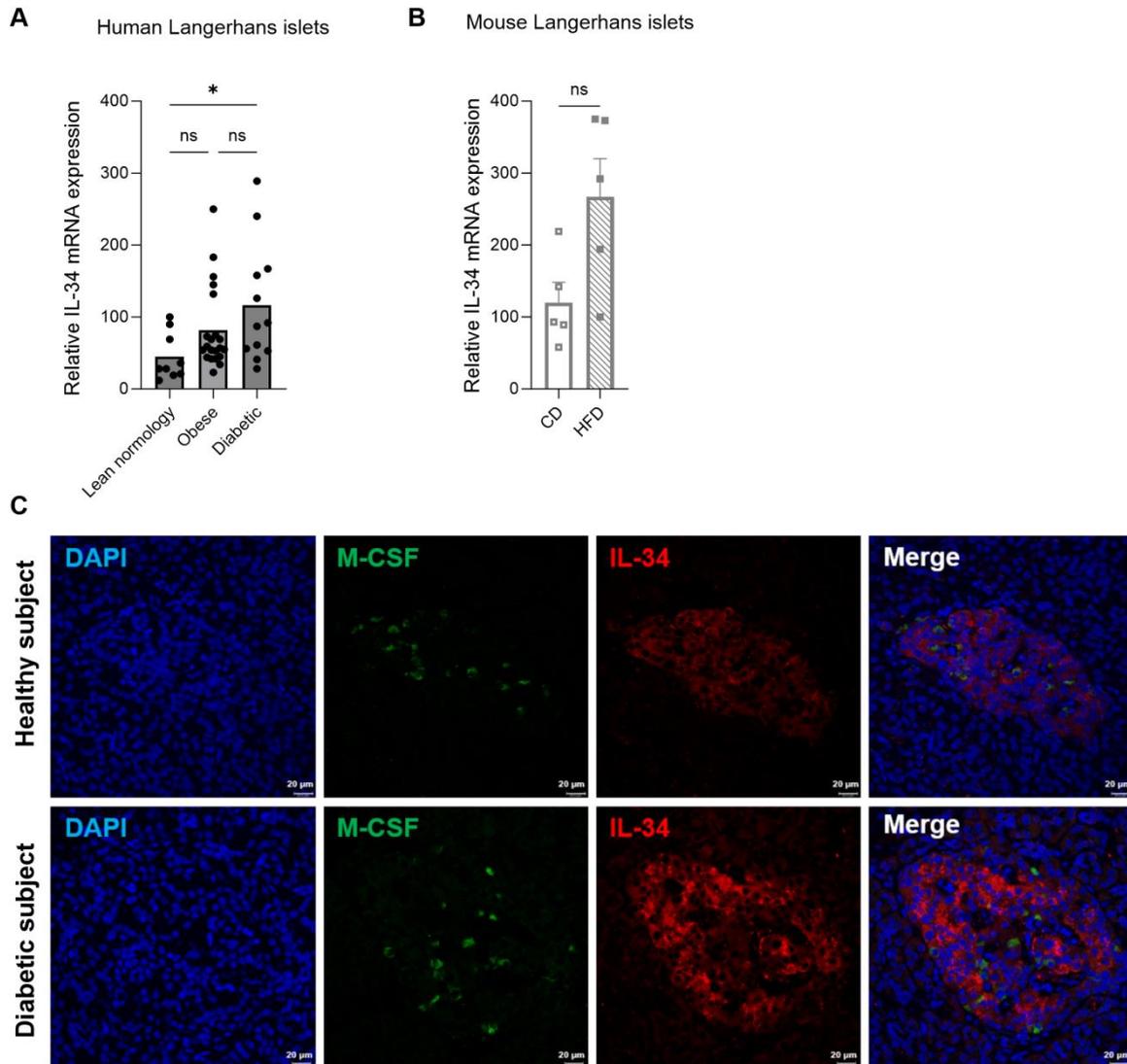


Figure 5. IL-34 expression is increased in the pancreas from obese and diabetic subjects. (A,B) the expression of the transcript encoding IL-34 was determined by RT-qPCR in human islets of Langerhans from lean normology, obese and diabetic patients ($n= 8-21$ per group) (A) and in mouse islets of Langerhans from control mice ($n=5$) fed conventional diet (CD) or high fat diet (HFD) (B). Results are expressed as relative mRNA expression (mean \pm SEM, * $p<0.05$; Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests). (C) Analysis of IL-34 and M-CSF expression by immunofluorescence in pancreas sections from a healthy subject (upper panel) and from a diabetic subject (lower panel). M-CSF, FITC (green); IL-34, TRITC (red); Nuclei, DAPI (blue). Scale bar = 20 μ m.

Discussion

In this study, we demonstrate that IL-34 is expressed by pancreatic β -cells in both mice and humans. Mice invalidated for IL-34 in pancreatic β -cells show impaired glucose metabolism as they age, a process associated with local inflammation. Beyond identification of the pancreas as a novel IL-34-expressing tissue, our results reveal that IL-34 is a pivotal contributor to glucose homeostasis through its ability to mitigate local inflammation.

In order to investigate the role of IL-34 in the function of islets of Langerhans, we generated mice specifically invalidated for IL-34 expression in pancreatic β -cells. We observed that these mice, as they aged or when they were subjected to a high-fat diet, exhibited an increase in pancreatic pro-inflammatory cytokines compared with control mice and that this phenotype associated with impaired glucose tolerance and with a more pronounced dysregulated insulin secretion. Taking into account that IL-34 is a regulatory cytokine, these results suggest that the lack of IL-34 expression by β -cells may have exacerbated local inflammation (that develops during aging or is induced by a pro-inflammatory diet) and is responsible, at least in part, for pancreatic immune dysregulation.

IL-34 is a critical actor of inflammation in several diseases (Ciccia et al., 2013; Franzè et al., 2015; Baek et al., 2015; Tian et al., 2013; Wang et al., 2016; Lin et al., 2019), including T2D and obesity (Below et al., 2011; Chang et al., 2014; Mostafa et al., 2021; Zorena et al., 2016). IL-34 levels correlated with chronic inflammation and susceptibility to insulin-resistant T2D (Mostafa et al., 2021). Mechanistically, IL-34 is overexpressed by adipocytes and elevated levels of serum IL-34 are detected in obese women (Chang et al., 2014). In addition, studies using the mouse β -cell line MIN6 have suggested that IL-34 may reduce insulin secretion (Piao et al., 2019). Nevertheless, we failed in detecting an intrinsic effect of IL-34 on GSIS using isolated islets of Langerhans, suggesting that this mechanism *per se* is not sufficient to explain the phenotype observed in our study.

Our results revealed that the metabolism was progressively altered during aging in IL-34 ^{Δ Pdx} mice, as evidenced by glucose and insulin dysregulation. Aging is characterized by a progressive loss of the immune functions, a process called immunosenescence which is associated with an increase of inflammatory cytokine production (Franceschi et al., 2018). This chronic and low-grade inflammation, called inflammaging, is suspected to contribute to the development of age-related diseases, such as cardiovascular disease, diabetes, and neurodegenerative disorders (Fulop et al., 2018). Our results suggest that IL-34 may act as a regulator of inflammaging in pancreas. Remarkably, we did not detect any modification of

circulating IL-34 levels in aged mice compared to young mice in both IL-34^{ΔPdx} mice and littermates, underlining that IL-34 may exert its role locally and that the absence of IL-34 in the pancreas was not compensated by systemic IL-34.

The elevated expression of CD11c, CD115 and inflammatory cytokines in aged mice suggested that pancreatic resident myeloid cells acquire an inflammatory phenotype. Interestingly, this inflammatory phenotype tended to be more pronounced in islets of Langerhans isolated from IL-34^{ΔPdx} mice compared to control mice. These results support the fact that IL-34 functions as an endogenous regulatory cytokine. In agreement with this hypothesis, studies reported that IL-34 is produced by human adipocytes in response to IL-1 β and TNF α and that its levels are increased in obese patients (Chang et al., 2014). Energy homeostasis, metabolism, endocrine system and innate immunity are interconnected, and macrophages are positioned at the interface between immunity and metabolism (Franceschi et al., 2018). We can thus hypothesize that IL-34, a master regulator of macrophage activity, may control the inflammatory status of islets of Langerhans and that its deficiency exacerbates inflammation triggered by aging or by metabolic stress.

Chronic low-grade inflammation associated with aging has a direct impact on glucose homeostasis and insulin resistance, the latter being associated with β -cell compensation (Gupta et al., 2017; Hull et al., 2005; Sachdeva and Stoffers, 2009; Stamateris et al., 2013). We observed that, in our model, aging associates with increased hormonal gene expression in islets of Langerhans from both IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{f/f} mice. Since the pancreatic identity genes are overexpressed in β -cells from aged mice (Tudurí et al., 2022), this profile may compensate for the development of insulin resistance, which is a multifactorial process. These observations support the idea that an inflammatory environment can favor cell plasticity and islet remodeling. In line with this, we show that inflammatory profiles, which tend to be different in IL-34^{ΔPdx} mice compared to control mice, seem to have an impact on insulin secretion *in vitro*.

Aging and inflammaging emerge as major contributors to metabolic disorders, such as T2D. Our results showing that IL-34 levels are increased in islets of Langerhans from T2D subjects reinforce our hypothesis on its role as a regulator of pancreas function. Results showed that IL-34^{ΔPdx} mice have impaired glucose tolerance compared to control mice when fed HFD. Obesity is a major leading cause of insulin resistance that can ultimately induce T2D (Ruze et al., 2023). During this process, the function of islets of Langerhans, especially β -cells, is modified to compensate systemic metabolic changes including hyperglycemia. This process is initially characterized by an increase of β -cell mass in order to produce enough insulin to counteract insulin resistance in target tissues. However, the β -cell compensation observed

during obesity may lead to exhaustion of these cells and to apoptosis due to glucolipotoxicity, eventually leading to T2D (Hudish et al., 2019). Increased gene expression encoding inflammatory cytokines testifies to the development of obesity-induced chronic low-grade inflammation in our model.

In conclusion, we demonstrate for the first time that IL-34 is expressed in mouse and human lean and T2D pancreatic β -cells. Our results suggest that IL-34 may be produced in response to inflammaging or metaflammation, acting as a protective cytokine to maintain β -cell functions.

Ethics Statement.

Animal studies were approved by the Institutional ethics committee of Region des Pays de la Loire and authorized by the French Ministry of Research (agreements APAFIS#8256-2016121823456077/APAFIS #37469-2022052417088984 v3).

Author contributions.

CMD performed experiments, analyzed the data, drafted the figures and the manuscript. EC performed experiments; LP, RS, LB, GP performed experiments and analyzed the data. LR, MM, PP, NM, performed experiments. AS, JKC, CM, DC, PJ, JSA and YD discussed the results and contributed to the final manuscript. CB conceived the study, supervised the project and wrote the manuscript.

Acknowledgments.

The authors sincerely acknowledge Pr Colonna for providing IL-34^{ff} mice; Dr Boisson and Dr Hubert for providing glucometers. The authors thank members of the animal facility and of the cytometry and qPCR facility of the University of Angers for expert technical assistance.

This work was supported by institutional grants from Inserm, University of Angers and University of Lille and by grants from Agence Nationale pour la Recherche (EpiRNA-T2D, ANR-23-CE14-0040-01 to JSA), Institut Pasteur de Lille (CPER CTRL Melodie to EC and JSA), Fondation pour la Recherche Médicale (Grant EQU202103012732 to JSA), Conseil Régional Hauts de France and Métropole Européenne de Lille (to JSA) and Société Francophone du Diabète (to EC and JSA).

This work was performed in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the investment for the future program ANR-11-LABX-0016-01 and of the integrated research program 3I-Impact supported by the University of Angers and the University Hospital of Angers.

Disclosure.

The authors declare no competing financial interests.

References

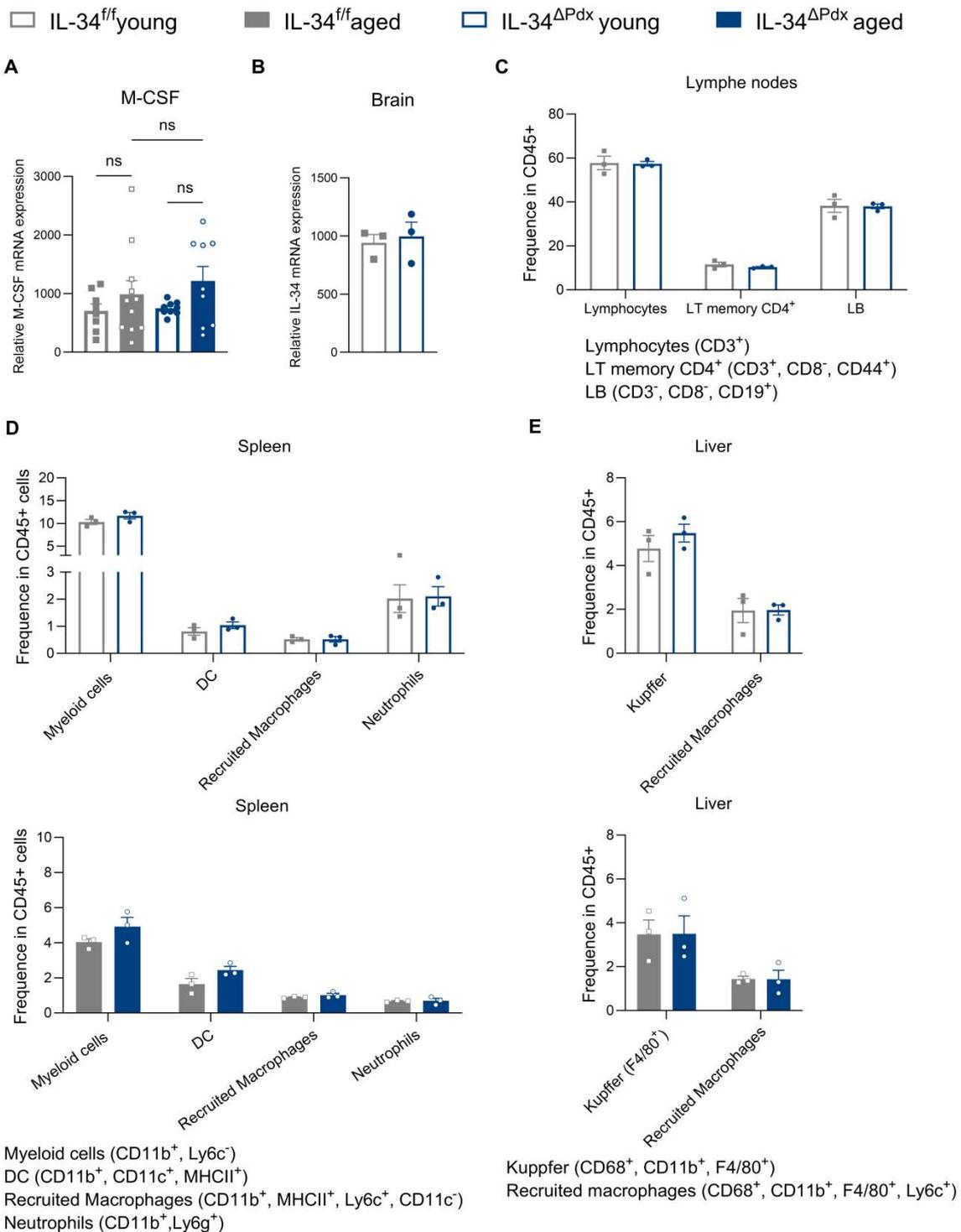
- Ahmed, B., Sultana, R., Greene, M.W., 2021. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 137, 111315. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315>
- Baek, J.-H., Zeng, R., Weinmann-Menke, J., Valerius, M.T., Wada, Y., Ajay, A.K., Colonna, M., Kelley, V.R., 2015. IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. *J. Clin. Invest.* 125, 3198–3214. <https://doi.org/10.1172/JCI81166>
- Below, J.E., Gamazon, E.R., Morrison, J.V., Konkashbaev, A., Pluzhnikov, A., McKeigue, P.M., Parra, E.J., Elbein, S.C., Hallman, D.M., Nicolae, D.L., Bell, G.I., Cruz, M., Cox, N.J., Hanis, C.L., 2011. Genome-wide association and meta-analysis in populations from Starr County, Texas, and Mexico City identify type 2 diabetes susceptibility loci and enrichment for expression quantitative trait loci in top signals. *Diabetologia* 54, 2047–2055. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2188-3>
- Caslin, H.L., Bhanot, M., Bolus, W.R., Hasty, A.H., 2020. Adipose tissue macrophages: Unique polarization and bioenergetics in obesity. *Immunol. Rev.* 295, 101–113. <https://doi.org/10.1111/imr.12853>
- Chang, E.-J., Lee, S.K., Song, Y.S., Jang, Y.J., Park, H.S., Hong, J.P., Ko, A.R., Kim, D.Y., Kim, J.-H., Lee, Y.J., Heo, Y.-S., 2014. IL-34 is associated with obesity, chronic inflammation, and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E1263-1271. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-4409>
- Ciccìa, F., Alessandro, R., Rodolico, V., Guggino, G., Raimondo, S., Guarnotta, C., Giardina, A., Sireci, G., Campisi, G., De Leo, G., Triolo, G., 2013. IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14(bright)CD16+ monocytes. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 1009–1017. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes435>
- Cucak, H., Grunnet, L.G., Rosendahl, A., 2014. Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* 95, 149–160. <https://doi.org/10.1189/jlb.0213075>
- De Tata, V., 2014. Age-related impairment of pancreatic Beta-cell function: pathophysiological and cellular mechanisms. *Front. Endocrinol.* 5, 138. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00138>
- Ehshes, J.A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J.A., Maor-Cahn, R., Gueripel, X., Ellingsgaard, H., Schneider, M.K.J., Biollaz, G., Fontana, A., Reinecke, M., Homo-Delarche, F., Donath, M.Y., 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356–2370. <https://doi.org/10.2337/db06-1650>
- Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Descamps, P., Ifrah, N., Delneste, Y., Jeannin, P., 2015. IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1 α . *Eur. J. Immunol.* 45, 1092–1102. <https://doi.org/10.1002/eji.201444606>
- Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Garo, E., Ifrah, N., Guardiola, P., Delneste, Y., Jeannin, P., 2013. IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS One* 8, e56045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056045>
- Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., Santoro, A., 2018. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 576–590. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0059-4>
- Franzè, E., Monteleone, I., Cupi, M.L., Mancìa, P., Caprioli, F., Marafini, I., Colantoni, A., Ortenzi, A., Laudisi, F., Sica, G., Sileri, P., Pallone, F., Monteleone, G., 2015. Interleukin-34 sustains inflammatory pathways in the gut. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 129, 271–280. <https://doi.org/10.1042/CS20150132>

- Fulop, T., Witkowski, J.M., Olivieri, F., Larbi, A., 2018. The integration of inflammaging in age-related diseases. *Semin. Immunol.* 40, 17–35. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.09.003>
- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., Becher, B., 2012. Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* 37, 1050–1060. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.001>
- Guillonneau, C., Bézie, S., Anegon, I., 2017. Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 2569–2586. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2482-4>
- Gupta, D., Jetton, T.L., LaRock, K., Monga, N., Satish, B., Lausier, J., Peshavaria, M., Leahy, J.L., 2017. Temporal characterization of β cell-adaptive and -maladaptive mechanisms during chronic high-fat feeding in C57BL/6NTac mice. *J. Biol. Chem.* 292, 12449–12459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781047>
- Hill, D.A., Lim, H.-W., Kim, Y.H., Ho, W.Y., Foong, Y.H., Nelson, V.L., Nguyen, H.C.B., Chegireddy, K., Kim, J., Habertheuer, A., Vallabhajosyula, P., Kambayashi, T., Won, K.-J., Lazar, M.A., 2018. Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E5096–E5105. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802611115>
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V.E., Hruban, R.H., Lowy, A.M., Tuveson, D.A., 2003. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00309-x](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00309-x)
- Hotamisligil, G.S., 2017. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 542, 177–185. <https://doi.org/10.1038/nature21363>
- Hudish, L.I., Reusch, J.E., Sussel, L., 2019. β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 129, 4001–4008. <https://doi.org/10.1172/JCI129188>
- Hull, R.L., Kodama, K., Utzschneider, K.M., Carr, D.B., Prigeon, R.L., Kahn, S.E., 2005. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48, 1350–1358. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1772-9>
- Lee, Y.S., Olefsky, J., 2021. Chronic tissue inflammation and metabolic disease. *Genes Dev.* 35, 307–328. <https://doi.org/10.1101/gad.346312.120>
- Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., Hollenbaugh, D., Linnemann, T., Qin, M., Wong, J., Chu, K., Doberstein, S.K., Williams, L.T., 2008. Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320, 807–811. <https://doi.org/10.1126/science.1154370>
- Lin, K., Ma, J., Peng, Y., Sun, M., Xu, K., Wu, R., Lin, J., 2019. Autocrine Production of Interleukin-34 Promotes the Development of Endometriosis through CSF1R/JAK3/STAT6 signaling. *Sci. Rep.* 9, 16781. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52741-1>
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117, 175–184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>
- Moon, S.-J., Hong, Y.-S., Ju, J.H., Kwok, S.-K., Park, S.-H., Min, J.-K., 2013. Increased Levels of Interleukin 34 in Serum and Synovial Fluid Are Associated with Rheumatoid Factor and Anticyclic Citrullinated Peptide Antibody Titers in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 40, 1842–1849. <https://doi.org/10.3899/jrheum.130356>
- Mostafa, T.M., El-Gharbawy, N.M., Werida, R.H., 2021. Circulating IRAPe, Irisin, and IL-34 in Relation to Insulin Resistance in Patients With Type 2 Diabetes. *Clin. Ther.* 43, e230–e240. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.05.003>

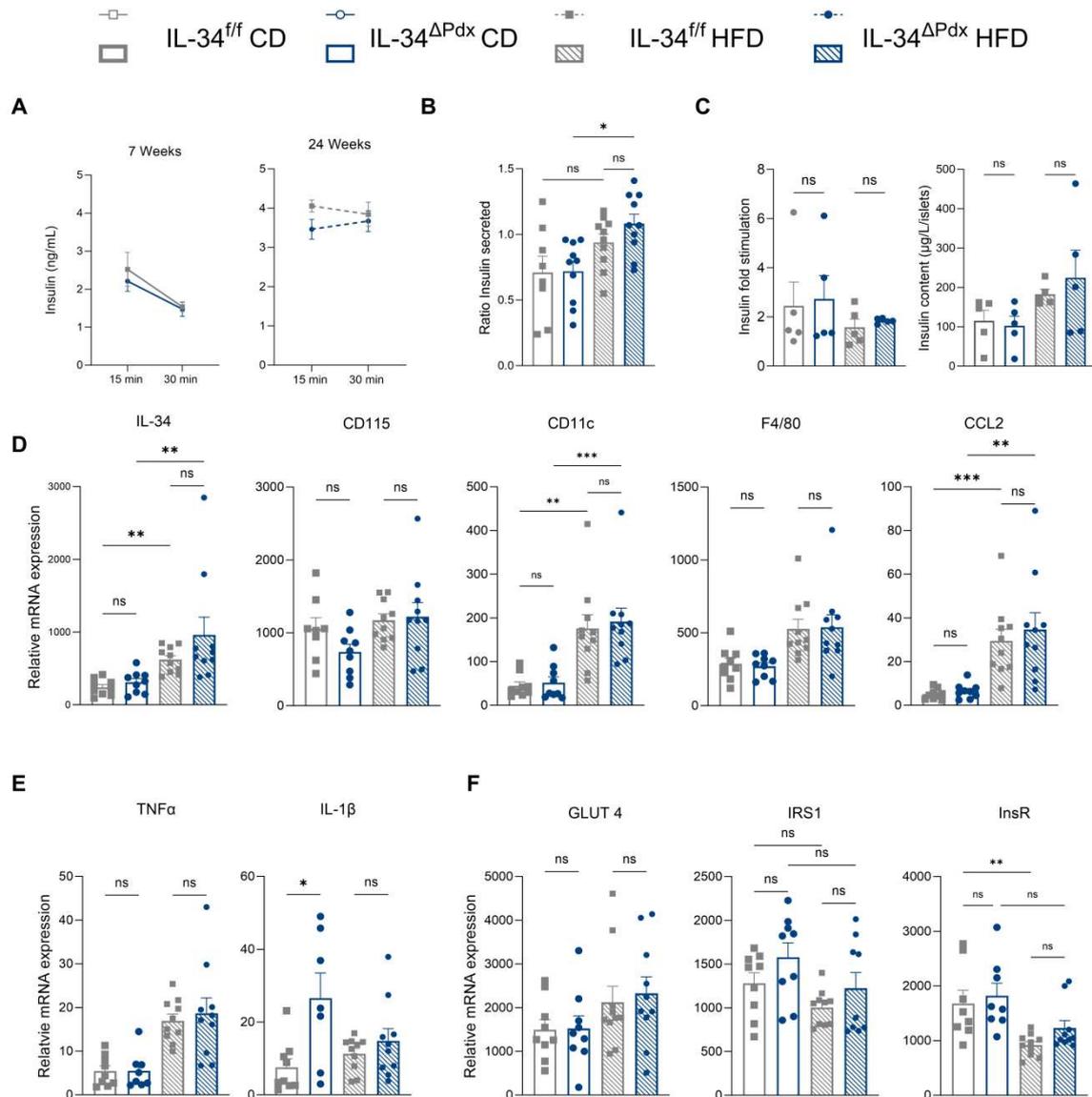
- Piao, C., Wang, X., Peng, S., Guo, X., Zhao, H., He, L., Zeng, Y., Zhang, F., Zhu, K., Wang, Y., 2019. IL-34 causes inflammation and beta cell apoptosis and dysfunction in gestational diabetes mellitus. *Endocr. Connect.* 8, 1503–1512. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0436>
- Preisser, L., Miot, C., Le Guillou-Guillemette, H., Beaumont, E., Foucher, E.D., Garo, E., Blanchard, S., Frémaux, I., Croué, A., Fouchard, I., Lunel-Fabiani, F., Boursier, J., Roingeard, P., Calès, P., Delneste, Y., Jeannin, P., 2014. IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* 60, 1879–1890. <https://doi.org/10.1002/hep.27328>
- Rohm, T.V., Meier, D.T., Olefsky, J.M., Donath, M.Y., 2022. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity* 55, 31–55. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.013>
- Ruze, R., Liu, T., Zou, X., Song, J., Chen, Y., Xu, R., Yin, X., Xu, Q., 2023. Obesity and type 2 diabetes mellitus: connections in epidemiology, pathogenesis, and treatments. *Front. Endocrinol.* 14, 1161521. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1161521>
- Sachdeva, M.M., Stoffers, D.A., 2009. Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol. Endocrinol.* 23, 747–758. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0400>
- Santoro, A., Bientinesi, E., Monti, D., 2021. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res. Rev.* 71, 101422. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101422>
- Stamateris, R.E., Sharma, R.B., Hollern, D.A., Alonso, L.C., 2013. Adaptive β -cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E149–159. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00040.2013>
- Tian, Y., Shen, H., Xia, L., Lu, J., 2013. Elevated Serum and Synovial Fluid Levels of Interleukin-34 in Rheumatoid Arthritis: Possible Association with Disease Progression via Interleukin-17 Production. *J. Interferon Cytokine Res.* 33, 398–401. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0122>
- Tudurí, E., Soriano, S., Almagro, L., Montanya, E., Alonso-Magdalena, P., Nadal, Á., Quesada, I., 2022. The pancreatic β -cell in ageing: Implications in age-related diabetes. *Ageing Res. Rev.* 80, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101674>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Wang, B., Ma, Z., Wang, M., Sun, X., Tang, Y., Li, M., Zhang, Y., Li, F., Li, X., 2017. IL-34 Upregulated Th17 Production through Increased IL-6 Expression by Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes. *Mediators Inflamm.* 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/1567120>
- Wang, H., Cao, J., Lai, X., 2016. Serum Interleukin-34 Levels Are Elevated in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Mol. Basel Switz.* 22, E35. <https://doi.org/10.3390/molecules22010035>
- Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760. <https://doi.org/10.1038/ni.2360>
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>
- Ying, W., Fu, W., Lee, Y.S., Olefsky, J.M., 2020. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 81–90. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0286-3>

- Ying, W., Lee, Y.S., Dong, Y., Seidman, J.S., Yang, M., Isaac, R., Seo, J.B., Yang, B.-H., Wollam, J., Riopel, M., McNelis, J., Glass, C.K., Olefsky, J.M., Fu, W., 2019. Expansion of Islet-Resident Macrophages Leads to Inflammation Affecting β Cell Proliferation and Function in Obesity. *Cell Metab.* 29, 457-474.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.003>
- Zorena, K., Jachimowicz-Duda, O., Wąż, P., 2016. The cut-off value for interleukin 34 as an additional potential inflammatory biomarker for the prediction of the risk of diabetic complications. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 21, 276–282. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2016.1138321>

Supplementary information



Supplemental Figure S1. (A,B) The expression of M-CSF mRNA was determined by RT-qPCR in IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{f/f} mice (n=3-20 per group). Results are expressed as relative expression compared with housekeeping genes. (C-E) The frequency of immune cells in lymph nodes (C), spleen (D) and liver (E) in young and aged IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{f/f} mice (n=3 per group) was analyzed by flow cytometry. (A-D) Results are expressed as mean ± SEM; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (Mann-Whitney test).



Supplemental Figure S2. (A) Insulin blood levels were quantified at 15 and 30 min during ipGTT in IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice before (7 weeks old, left panel) and at the end of HFD (24 weeks old, right panel) ($n=10$ per group). (B) Ratio of circulating insulin levels between 30 and 15 min after glucose injection in IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice under HFD ($n=10$ per group). (C) Islets of Langerhans isolated from IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice under HFD ($n=5$) were stimulated with a low (2.8 mM) or high (16.7 mM) concentration of glucose. Ratio based on insulin secretion has been calculated (left panel). Insulin content has been determined by ELISA in islets of Langerhans from IL-34^{ΔPdx} IL-34^{ff} mice under HFD ($n=5$) (right panel). (D-F) The expression of the transcripts encoding IL-34, CD115, CD11c, F4/80, CCL2 (D), IL-1 β , TNF α (E), GLUT4, InsR and IRS1 (F) in adipose tissue from IL-34^{ΔPdx} and IL-34^{ff} mice under HFD ($n=10$ per group) was determined by RT-qPCR. (D-F) Results are expressed as relative expression compared with housekeeping genes (mean \pm SEM; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test).

Supplemental methods

Isolation of immune cells and flow cytometry analysis.

Mice were anesthetized (ketamine/xylazine) and sacrificed by cervical dislocation before tissue harvesting. Spleens were crushed and splenocytes were then isolated after lysis of red blood cells. Liver was perfused with PBS and was enzymatically digested by GentleMacs Octo Dissociator with heater (Miltenyi biotec, Bergish Gladbach, Germany). After red blood cell lysis, immune cells were purified using centrifugation with Percoll density gradient (35-70%). Splenocytes and liver immune cells were resuspended in FACS buffer (1% BSA, 0.01% NaN₃ in PBS) and incubated for 10 minutes with antibodies listed in Table 1. Cells were then fixed and permeabilized (Foxp3/Transcription Factor Staining buffer set; Invitrogen, Waltham, MA) before CD68 staining. Data were acquired using a Cytoflex cytometer (Beckman-Coulter, Brea, CA) and analyzed using FlowJo software (BD Biosciences, Franklin lakes, NJ).

Antibody	Provider	Reference
BV421-labeled rat anti-CD49b	BD Bioscience	Cat #563063
Viogreen-labeled anti-CD45	Miltenyi biotec	Cat #130-102-412
FITC-labeled rat anti-CD8 α	BD Bioscience	Cat #553031
PerCP/Cyanine 5.5-labeled anti-CD3 ϵ	Biologend	Ca t#100327
PE-labeled anti-CD44	eBioscience	Cat #12-0441-83
PE/Cyanine 7-labeled anti-CD19	Biologend	Cat #115519
APC-labeled anti-CD62L	Biologend	Cat #400512
BV421-labeled anti-CD11c	BD Bioscience	Cat #565452
FITC-labeled anti-I-Ab	BD Bioscience	Cat #553551
PE-labeled anti-CD11b	eBioscience	Cat #12-0112-81
PE/Cyanine 7-labeled anti-Ly6c	Biologend	Cat #128017
APC-labeled anti-Ly6g	BD Bioscience	Cat #560599
V450-labeled anti-Ly6c	BD Bioscience	Cat #560594
PE-labeled anti-F4/80	Invitrogen	Cat #MF48004-3
Viogreen-labeled anti-ouse CD68	Miltenyi biotec	Cat #130-102-922
FITC-labeled anti-CD11c	Biologend	Cat #117306
APC-labeled anti-CD11b	Miltenyi biotec	Cat #130-091-241
APC/Cyanine 7-labeled anti-CD45	Miltenyi biotec	Cat #130-102-412
PerCP/Cyanine 5.5-labeled anti-I-A/I-E	BD Bioscience	Cat #562363
PE-labeled anti-CD3e	BD Bioscience	Cat #553064

Primers.

	Forward	Reverse
Murine B2M	CTCGCTCGGTGACCC	CGGGTGGAACTGTGTTACG
Murine TBP	CTATCACTCCTGCCACACC	TGTTCTTCACTCTTGGCTCC
Murine ACTB	GCTGTATTCCCCTCCATCG	GGTGAGCAGCACAGGG
Murine HPRT1	CGGGGGACATAAAAGTTATTGG	TTCGAGAGGTCCTTTTCACC
Murine IL-34	CCAACATCACAAGGCTGC	TCTCCAGCAATGTCTGAACC
Human IL-34	GTGCTTAGGCCTCTGTGGAC	GCCAAGGAAGATCCCAAGATA
Murine M-CSF	GATCCCTGAGTCTGTCTTCC	CACCTGTCTGTCCCTCATCC
Human M-CSF	GAAAGATCCAGTGTGCTACC	CTCATAGAAAGTTCGGACGC
Murine CD115	ACTGGTGAAGGATGGATACC	GCAGGTTAGCATAGTCCTGG
Human CD115	TGCAAGGTTTTAACTGGACC	ATATGACGCTTACCTCTGGG
Murine CD11c	TGTGAAGTTGCTTCTCCCG	GCAGATGTGGTCAGCTCC
Murine IL-6	TCTGCAAGAGACTTCCATCC	CCACGATTTCCAGAGAACA
Murine TNF α	TGTACCTTGTCTACTCCCAGG	AGGTATATGGGCTCATACCAGG
Murine IL-1 β	AAAGCTCTCCACCTCAATGG	GCCGTCTTTCATTACACAGG
Murine CCL2	CCTGCTGCTACTCATTACC	TGTATGTCTGGACCCATTCC
Murine F4/80	CGTGTTGTTGGTGGCACTGTGA	CCACATCAGTGTTCCAGGAGAC
Murine GLUT4	CCTGTAACCTCATTGTCGGC	TCTAAAAGGGAAGGTGTCCG
Murine Pdx1	ATTGTGCGGTGACCTCGGGC	GATGCTGGAGGGCTGTGGCG
Murine Mafa	TCCGACTGAAACAGAAGCGG	CTCTGGAGCTGGCACTTCTC
Murine glucagon	AGGCCGAGGAAGGCGAGACT	GGAGCCATCAGCGTGCCTGC
Murine Ins1	GCCAAACAGCAAAGTCCAGG	GTTGAAACAATGACCTGCTTGC
Murine Ins2	CAGCAAGCAGGAAGCCTATCT	CAGGTGGGAACCACAAAGGT

Discussion

Discussion

En conditions physiologiques, l'IL-34 est produite constitutivement dans différents tissus et dans différentes pathologies inflammatoires, l'IL-34 elle est surexprimée (Baghdadi et al., 2018; Lelios et al., 2020). Chez les personnes obèses, les cellules immunitaires induisent et entretiennent une inflammation du tissu adipeux via notamment la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Kawai et al., 2021). En réponse à cette inflammation, les adipocytes sécrètent également des cytokines parmi lesquelles l'IL-34 a été identifiée (Chang et al., 2014). L'IL-34 est de ce fait corrélée à l'installation de la résistance à l'insuline (Chang et al., 2014). L'inflammation induite par la situation d'obésité est un facteur de risque majeur au développement du diabète de type 2 (DT2). Chez les patients DT2, l'IL-34 est augmentée et corrélée positivement à la résistance à l'insuline (Mostafa et al., 2021). Des études bio-informatiques ont également identifié des SNPs sur le gène de *Il34* comme étant un facteur de risque pour le développement d'un DT2 (Below et al., 2011; Liao et al., 2014). Fort de ces observations, et comme le pancréas est un organe clé des régulations métaboliques présentant des dysfonctionnements lors d'un diabète, nous nous sommes interrogés dans un premier temps sur la possibilité que l'IL-34 soit produite à ce niveau. Nous avons mis en évidence une expression constitutive de l'IL-34 dans le pancréas et plus particulièrement dans les îlots de Langerhans chez l'homme et la souris. L'IL-34 dans les îlots humains est synthétisée par les cellules β productrices d'insuline. Afin de comprendre le rôle de l'IL-34 dans cet organe, nous avons dans un second temps mis en place un modèle de souris invalidée pour le gène de l'IL-34 dans ces cellules β . Suite à la caractérisation du modèle, en condition inflammatoire associée au vieillissement ou suite à l'induction d'une situation d'obésité, l'absence d'IL-34 dans les îlots de Langerhans exacerbe les effets de l'inflammation sur l'homéostasie du glucose. En outre, l'IL-34 pancréatique a été retrouvée augmentée chez les patients DT2 et chez les souris contrôles soumises à un régime riche en graisse et en sucre.

1. Production de l'IL-34 dans les îlots de Langerhans

L'analyse de l'expression de l'IL-34 comparativement à sa cytokine jumelle le M-CSF dans le pancréas humain a révélé une production de la cytokine dans les îlots de Langerhans. De façon intéressante, les cellules productrices de l'IL-34 dans les îlots sont distinctes et plus nombreuses que les cellules productrices de M-CSF suggérant un rôle additionnel ou spécifique de l'IL-34. En effet, malgré leur fonction similaire sur la différenciation des macrophages immunorégulateurs M2, les sources des deux cytokines peuvent être différentes localement. Au niveau de la peau par exemple, l'IL-34 est produite dans l'épiderme et le M-CSF est produit dans le derme assurant un rôle spécifique de l'IL-34 sur la différenciation et le maintien des cellules de Langerhans. De même, dans le cancer, l'IL-

34 est majoritairement produite par les cellules cancéreuses tandis que le M-CSF est sécrété par les macrophages recrutés et les TAMs (Franzè et al., 2020b; Freuchet et al., 2021). L'analyse de l'expression du gène de l'IL-34 par les îlots de Langerhans a été confirmée chez des sujets sains et chez des souris sauvages C57BL6/J. Par des analyses de co-marquages entre l'IL-34 et les principales hormones produites dans les îlots de Langerhans sur des coupes humaines, nous avons identifié une colocalisation entre la cytokine et l'insuline produite par les cellules β du pancréas. Ainsi, l'IL-34 semble produite par les cellules β des îlots de Langerhans, reste à comprendre quelle est son action dans cet organe : effet juxtacrine ? effet autocrine ? et si son action se cantonne à cet organe ou est retrouvée à distance : effet paracrine ou endocrine ?

2. Validation du modèle de souris

La mise en place d'un modèle de souris basé sur le système Cre/Loxp pour invalider le gène de l'IL-34 dans les cellules β pancréatiques uniquement nous a permis de comprendre le rôle de la cytokine dans les îlots de Langerhans. Dans notre modèle de souris, l'expression de la recombinaise cre est dépendante du facteur de transcription Pdx1. C'est un des gènes précoces dans le développement embryonnaire et qui persiste dans les cellules β pancréatiques matures. Il a été utilisé dans de nombreux modèles murins pour étudier le développement et la fonction du pancréas (Ebrahim et al., 2022; Magnuson and Osipovich, 2013). L'analyse de l'expression d'IL-34 dans les îlots de Langerhans des souris d'intérêt IL-34 ^{Δ Pdx} a confirmé une inhibition d'expression de la cytokine par rapport aux souris sœurs contrôles, n'exprimant pas l'enzyme cre (IL-34^{f/f}) et présentant un profil d'expression similaire aux souris C57BL6/J non issues du croisement. Cependant l'invalidation du gène de l'IL34 au niveau des cellules β des souris IL-34 ^{Δ Pdx} n'as pas entraîné une inhibition complète de son expression en ARN suggérant que d'autres types cellulaires semblent exprimer la cytokine dans les îlots de Langerhans murins. La dissociation et l'analyse transcriptionnelle des cellules composant les îlots pancréatiques permettraient d'identifier les autres types cellulaires exprimant l'IL-34. Il est également possible que des cellules immunitaires intra-îlots expriment la cytokine. Néanmoins, la différence d'expression du gène est significative entre les souris IL-34 ^{Δ Pdx} et IL-34^{f/f} validant l'inhibition propre aux cellules β . L'inhibition d'expression d'IL-34 dans les îlots de Langerhans des souris IL-34 ^{Δ Pdx} n'a pas entraîné de différence sur la croissance comparativement aux souris IL-34^{f/f}. L'analyse du taux d'IL-34 sérique chez des femmes atteintes de diabète gestationnel a montré une surexpression en comparaison aux femmes enceintes ne présentant pas de complications (Piao et al., 2019). De plus, l'identification de SNPs sur le gène de l'IL-34 comme facteurs prédictifs pour le développement d'un DT2 a été réalisée sur une cohorte de femme (Below et al., 2011). C'est pourquoi nous avons décidé

de nous focaliser sur les souris femelles pour cette étude. L'analyse phénotypique des souris IL-34^{ΔPdx} mâles devra être faite par la suite.

3. Conséquence de l'inhibition d'IL-34 sur l'inflammation locale

L'étude de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α dans les îlots de Langerhans a révélé une augmentation plus importante chez les souris IL-34^{ΔPdx} par rapport aux souris IL-34^{f/f} dans un contexte de vieillissement et également suite à l'induction d'une situation d'obésité par un régime riche en graisse et en sucre (HFD). Cette augmentation des cytokines pro-inflammatoires chez les souris IL-34^{ΔPdx} est associée à une tolérance au glucose diminuée. Il est établi que le vieillissement s'accompagne de l'apparition de dommages de l'ADN, d'une senescence exacerbée, d'une augmentation du stress oxydatif, d'un épuisement des cellules souches et d'une communication intracellulaire altérée (López-Otín et al., 2013). Ces modifications sont associées à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires favorisant un statut d'inflammation stérile, chronique et systémique appelée « inflammaging » (Santoro et al., 2021). Le taux d'IL-34 circulant est augmenté dans de nombreuses pathologies inflammatoires cependant nous n'avons pas observé de différences au niveau sérique chez les souris âgées suggérant que le rôle de la cytokine est restreint aux îlots de Langerhans.

Le vieillissement et cet état d'inflammaging participent à une baisse de la sécrétion et de l'action de l'insuline. Ces désordres métaboliques et immunitaires favorisent l'apparition de maladies liées à l'âge, comme le cancer, des maladies cardiovasculaires, des maladies neurologiques ou encore des maladies métaboliques (De Tata, 2014). Il est aujourd'hui avéré qu'une situation d'obésité s'accompagne du développement d'une inflammation chronique de bas grade, un facteur de risque majeur pour le développement du DT2 (Kawai et al., 2021). Ce statut inflammatoire, associé au métabolisme a donné naissance à la notion de « métaflammation ». L'inflammaging et la métaflammation partagent donc des caractéristiques cellulaires et moléculaires telles que le niveau élevé de cytokines pro-inflammatoires systémiques (Prattichizzo et al., 2018). Dans un contexte d'obésité, les souris IL-34^{ΔPdx} ont une altération du métabolisme du glucose significativement plus importante que les souris contrôles. Ainsi, l'induction d'une inflammation chronique de bas grade chez les souris par la mise sous régime HFD dès le plus jeune âge accélère et tend à augmenter le phénotype observé chez les souris IL-34^{ΔPdx} vieillissantes. Le vieillissement est également associé à des changements morphologiques : augmentation de l'adiposité et diminution de la masse musculaire qui favorisent l'inflammaging et participent au développement des désordres métaboliques (De Tata, 2014; Varghese et al., 2021). Les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} en vieillissant présentent une prise de poids similaire ce qui suggère que l'inflammation locale observée dans les îlots de Langerhans est

directement liée à l'inhibition de l'IL-34 chez les souris IL-34^{ΔPdx}. De plus, le taux d'insuline sérique chez les souris IL-34^{f/f} jeunes tend à être plus élevé que chez les souris IL-34^{ΔPdx} confirmant un effet local de l'immunité sur la sécrétion d'insuline qui sera accentué en condition d'inflammaging.

La naissance d'une inflammation chronique de bas grade dans le contexte d'obésité a lieu au niveau du tissu adipeux avec un recrutement de monocytes important et une différenciation en macrophages pro-inflammatoires M1 (Lumeng et al., 2007). L'analyse de l'expression du gène codant la chimiokine *CCL2* dans le tissu adipeux montre une augmentation chez les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} sous HFD associée à une augmentation d'expression du marqueur de surface F4/80 reflétant un recrutement de monocytes. L'élévation transcriptionnelle du marqueur de surface CD11c et du TNF α témoigne d'une polarisation des macrophages pro-inflammatoires M1 chez les souris sous HFD. L'inflammation induite dans le tissu adipeux n'a pas montré de différences entre les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} sous HFD. Également, l'expression en ARNm des gènes codants le transporteur au glucose *GLUT4* et celui du récepteur *InsR* est similaire entre les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} sous HFD. L'expansion du tissu adipeux et la glucolipotoxicité associée jouent un rôle prépondérant dans le développement de l'inflammation et d'une résistance à l'insuline (Galicia-Garcia et al., 2020) mais la réponse du tissu semble similaire entre les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} sous HFD confirmant l'impact de la déplétion du gène de *Il34* au niveau local dans les îlots de Langerhans. La prise de poids tend à être plus importante pour les souris IL-34^{ΔPdx} sous HFD et est associée à une augmentation significative de la glycémie à jeun après 4 mois de régime. Ces observations suggèrent l'établissement d'un défaut de réponse des îlots pancréatiques. Aussi, l'insulinémie à jeun des souris IL-34^{ΔPdx} est significativement impactée par la mise en place du régime HFD comparativement aux souris contrôles. L'élévation de la glycémie à jeun associée à la diminution d'insuline chez les souris IL-34^{ΔPdx} est en accord avec la diminution de la tolérance au glucose après le régime HFD et indiquent que l'absence d'IL-34 dans les îlots de Langerhans a un impact sur la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques favorisée par une inflammation locale plus importante.

Nous avons observé une augmentation d'expression des gènes codants les marqueurs de surface CD11c et CD115 dans les îlots de Langerhans des souris IL-34^{ΔPdx} et contrôles âgées. Cette élévation transcriptionnelle témoigne d'une augmentation du profil inflammatoire des cellules myéloïdes dans les îlots de Langerhans. Les macrophages jouent un rôle prépondérant dans l'immunité locale des îlots de Langerhans et voient leur nombre augmenté en cas d'inflammation. Des études ont montré que les macrophages des îlots de Langerhans présentent un profil activé M1 avec une expression de CD11c (Calderon et al., 2015; Ying et al., 2019). Chez les souris IL-34^{ΔPdx} sous HFD, l'expression du transcrit codant la chimiokine *CCL2* est significativement plus élevée que chez les souris

IL-34^{f/f} sous HFD. Des études ont montré que la reconnaissance des acides gras libres par les TLRs exprimés à la surface cellules β favorisent l'activation de la voie NF κ B et la production de chimiokines telles que CCL2 ou CXCL2 (Igoillo-Esteve et al., 2010; Eguchi et al., 2012). Cette expression de chimiokines est directement impliquée dans la différenciation de macrophages pro-inflammatoires M1. Ce profil de macrophages pro-inflammatoires M1 est associé à une production des cytokines pro-inflammatoires et l'inhibition de l'IL-34 dans les îlots de Langerhans semblent favoriser l'augmentation et la polarisation de ces macrophages. De plus, les souris IL-34^{f/f} sous HFD ne présentent pas d'élévation significative du gène codant le marqueur de surface CD11c ainsi que des gènes codant le TNF α et l'IL-1 β dans les îlots de Langerhans ce qui tend à confirmer le rôle prépondérant de l'IL-34 dans les mécanismes inflammatoires. En lien avec ces observations, il a été montré que l'expression d'IL-34 pouvait être induite par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α notamment par les adipocytes chez les patients obèses (Chang et al., 2014). Tenant compte du rôle de l'IL-34 dans la différenciation et la prolifération des macrophages immunorégulateurs M2, nos résultats suggèrent que la cytokine joue un rôle majeur dans la régulation des macrophages dans le microenvironnement des îlots pancréatiques. Et son absence exacerbe les mécanismes inflammatoires initiés par le vieillissement et l'obésité.

4. Conséquence de l'inhibition de l'IL-34 et de l'inflammation sur les cellules β

L'augmentation de la production d'IL-1 β joue un rôle sur l'altération de la sécrétion d'insuline. En effet, les cellules β qui expriment le récepteur à l'IL-1 β sont des cibles directes de l'augmentation de la production de la cytokine dans les îlots pancréatiques (Wen et al., 2011). L'analyse de la capacité de sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans *ex vivo* nous a permis de confirmer l'impact négatif des cytokines pro-inflammatoires sur la sécrétion d'insuline. Et nous avons mis en évidence le rôle protecteur apporté par l'IL-34 exogène face aux effets délétères de l'IL-1 β et du TNF α sur la sécrétion d'insuline par les îlots après stimulation au glucose. Ces tests ont également montré, qu'en présence d'IL-34 et des cytokines pro-inflammatoires, les îlots des souris âgées et de façon plus prononcée pour les souris IL-34 ^{Δ Pdx}, avaient une réponse moins efficace que les souris jeunes après stimulation. Cela laisse sous-entendre que l'absence d'IL-34 exacerbe les effets de l'inflammation dans les îlots de Langerhans qui gardent une empreinte inflammatoire altérée même après l'ajout d'IL-34 en condition d'inflammation induite. L'étude du rôle de l'IL-34 sur une lignée de cellules β murine (lignée MIN6) a montré que la cytokine pouvait augmenter la sécrétion d'insuline (Piao et al., 2019). Cependant, nous n'avons pas observé de différence sur la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans issus des souris

IL-34^{ΔPdx} et contrôles en présence d'IL-34 suggérant que ce mécanisme n'est pas suffisant pour expliquer le phénotype observé dans notre étude.

L'inflammation chronique joue un rôle direct sur l'homéostasie du glucose et sur la sécrétion d'insuline notamment par une modulation de la fonction des cellules β. Nous avons observé une surexpression des gènes codant les facteurs de transcription *Pdx1* et *Mafa* similaire chez les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} âgées qui s'accompagne d'une surexpression des gènes hormonaux suggérant que le vieillissement a un impact direct sur les cellules β. Dans la littérature, l'analyse de la sécrétion d'insuline après stimulation au glucose montre une augmentation chez les souris âgées (Gregg et al., 2016). Dans notre étude, les souris âgées présentent également une augmentation de la sécrétion d'insuline après l'injection de glucose qui semble être plus prononcée chez nos souris IL-34^{ΔPdx}. Nous n'avons pas d'informations sur la quantité d'insuline circulante chez les souris âgées en conditions physiologiques, mais l'augmentation après stimulation au glucose reste concordante avec l'expression des gènes pancréatiques. La masse des cellules β est relativement préservée chez l'homme en vieillissant (Saisho et al., 2013, p. 201; Tudurí et al., 2022b) ce qui n'est pas le cas chez la souris âgées qui présentent une masse des cellules β augmentée (Tudurí et al., 2022a). Ainsi, la surexpression des transcrits de ces gènes pancréatiques semble souligner un remodelage des îlots pancréatiques chez les souris âgées en réponse notamment à l'inflammation locale et au développement d'une résistance à l'insuline progressive. *In vitro*, nous n'avons pas observé d'augmentation de sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans issus de souris âgées par rapport aux souris jeunes. Cependant, les études sur la fonction des cellules β *in vitro* chez les souris âgées sont très hétérogènes et nécessitent de prendre en compte les effets de l'âge sur la sensibilité à l'insuline au niveau périphérique (Tudurí et al., 2022b, 2022a). L'inflammation chronique de bas grade induite par le régime riche en graisse et en sucre semble accélérer le phénomène de remodelage pancréatique chez les souris IL-34^{ΔPdx}. En effet, l'augmentation d'expression des gènes codants les facteurs de transcription *Mafa* et *Pdx1* est plus importante pour les souris IL-34^{ΔPdx} par rapport aux souris contrôles sous HFD. Il en est de même pour les gènes hormonaux indiquant que les îlots de Langerhans des souris IL-34^{ΔPdx} où l'inflammation est plus prononcée, favorise un remodelage exacerbé en l'absence d'IL-34. Nos analyses sur la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques de souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} sous HFD n'ont pas permis d'observer de différences sécrétoires *in vitro*.

5. La metaflammation et l'expression d'IL-34

Une augmentation d'expression protéique et transcriptionnelle de l'IL-34 est observée dans de nombreuses pathologies inflammatoires (Baghdadi et al., 2018). Après la mise en place du régime riche en graisse et en sucre, nous avons observé une surexpression du gène codant *Il34* dans les îlots

de Langerhans des souris IL-34^{f/f} par rapport aux souris IL-34^{f/f} sous régime conventionnel. Parallèlement, l'expression en ARNm du M-CSF n'est pas modifiée dans les îlots pancréatiques des souris sous régime HFD confirmant le rôle prépondérant et unique de l'IL-34 dans l'inflammation locale. Comme identifiée précédemment dans la littérature, l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires semble participer à l'induction de l'expression d'IL-34 au niveau îlots de Langerhans dans notre étude. L'inflammation développée dans le vieillissement ou par une situation d'obésité est un facteur de risque pour le développement d'un DT2 (Hotamisligil, 2017). L'analyse de l'expression de l'IL-34 dans les îlots de Langerhans issus de patients sains, obèses ou diabétiques a révélé une augmentation significative chez les patients diabétiques avec un niveau d'augmentation intermédiaire chez les patients obèses. Le marquage de l'IL-34 dans les îlots pancréatiques issus de patients diabétiques nous a permis de confirmer cette surexpression de la cytokine comparativement à des sujets sains. Cette augmentation de production associée aux résultats précédents semble indiquer que la production d'IL-34 participe à la régulation de l'inflammation dans les îlots de Langerhans. En condition de stress, les cellules β pancréatiques vont sécréter l'IL-34 qui module l'immunité locale afin de maintenir la sécrétion d'insuline et l'homéostasie du glucose. Cependant il n'est pas exclu que la surexpression de l'IL-34 atteigne un niveau où ses effets immunorégulateurs soient altérés. En effet, les cytokines coordonnent les signaux inflammatoires et leurs circuits de signalisation incluent de multiples points de contrôle pour permettre au tissu cible de retourner à un stade homéostatique. Prenons l'exemple de l'IL-1 β , Dror et coll. ont mis en évidence un rôle bénéfique de la cytokine dans le métabolisme du glucose (Dror et al., 2017). Après la prise de nourriture, les macrophages pro-inflammatoires sécrètent l'IL-1 β qui favorise la sécrétion d'insuline. Une fois sécrétée, l'insuline agit directement sur les macrophages au profil M1 pour favoriser l'activité glycolytique (Dror et al., 2017). L'IL-1 β joue donc un rôle bénéfique sur la glycémie en condition physiologique post-prandiale, mais devient délétère pour les îlots de Langerhans en situation inflammatoire chronique. Il pourrait en être de même pour les effets de l'IL-34 lorsque la balance tend vers une inflammation trop importante.

En conclusion, nous avons mis en évidence une expression constitutive de l'IL-34 dans les îlots pancréatiques qui est surexprimée dans le DT2. L'inhibition de son expression par les cellules β pancréatiques nous a permis de montrer son rôle majeur dans l'immunité locale dans un contexte d'inflammaging ou de métaflammation. Malgré des études contradictoires sur le rôle de l'IL-34 en conditions pathologiques, nous montrons ici un rôle modulateur de la cytokine pour maintenir la fonction des cellules β .

Perspectives

Perspectives

Les macrophages sont des cellules immunitaires jouant un rôle majeur dans l'homéostasie des îlots pancréatiques (Cosentino and Regazzi, 2021). L'IL-34 est avant tout connue pour son rôle sur la différenciation des monocytes en macrophages immunorégulateurs de type M2 (IL-10^{high}IL-12^{low}) (Foucher et al., 2013). Dans ce contexte et en lien avec nos observations, il serait essentiel d'avoir un profil phénotypique et une fréquence des macrophages dans les îlots de Langerhans des souris IL-34^{ΔPdx} en condition d'homéostasie et en condition inflammatoire. Nous envisageons donc d'isoler les îlots de Langerhans chez les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} jeunes et âgées et de les dissocier afin d'analyser les populations mono-macrophagiques non seulement par cytométrie en flux, mais également par cytométrie de masse ou CyTOF (Cytometry by Time of Flight). Cette technique repose sur l'utilisation d'anticorps couplés à des isotopes non-radioactifs de métaux lourds et non des fluorochromes comme pour la cytométrie en flux. La détection des isotopes des anticorps se fait par spectrométrie de masse et permet ainsi l'analyse de plus de 30 marqueurs. Ces analyses permettront d'une part d'avoir des informations sur l'évolution cinétique de la fréquence des macrophages dans les îlots de Langerhans et de les comparer entre les souris contrôles IL-34^{ΔPdx}, et d'autre part, nous aurons une idée du profil phénotypique des macrophages chez les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} et de leur évolution pendant le vieillissement. Selon les différences observées, les données obtenues permettront de comprendre l'implication de l'IL-34 au niveau de l'immunité des îlots de Langerhans à travers la caractérisation des cellules mono-macrophagiques.

Dans le but de compléter ces observations, il serait intéressant de dépléter les macrophages intra-îlots chez les souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f} afin de confirmer le rôle paracrine/juxtacrine de l'IL-34 produite par les cellules β sur les macrophages. Cependant, il n'existe pas de marqueur spécifique des macrophages pancréatiques permettant leur déplétion seule. Une déplétion systémique par l'utilisation d'une solution de clodronate encapsulée dans les liposomes pourrait être utilisée en connaissant l'écueil sur la déplétion des autres cellules myéloïdes phagocytaires (Moreno, 2018). *In vivo*, le traitement aux liposomes de clodronate tel qu'il a été réalisé dans l'étude de Westwell-Roper et al (Westwell-Roper et al., 2014) permettrait néanmoins de valider si les macrophages des îlots pancréatiques sont un intermédiaire de l'action de l'IL-34 localement.

In vitro, le traitement des îlots de Langerhans avec du clodronate aiderait également à comprendre les mécanismes de communication entre les macrophages et les cellules β et de valider l'impact sur la sécrétion d'insuline par des tests de GSIS sur les îlots issus des souris IL-34^{ΔPdx} et IL-34^{f/f}. Aussi, toujours dans le but d'analyser les mécanismes impliqués dans le dialogue entre les macrophages et les cellules β pancréatiques, il serait intéressant de pouvoir transposer les effets de l'IL-34 observés dans notre modèle murin *in vitro* chez l'humain. La lignée cellulaire EndoC-Bh1 est une lignée de cellules β

humaines génétiquement créé en 2011 (Ravassard et al., 2011). Cette lignée ressemble fortement aux cellules β humaines dans ses capacités de sécrétion d'insuline après stimulation et dans les réponses induites par les cytokines pro-inflammatoires (Tsonkova et al., 2017). L'acquisition de cette lignée humaine permettrait la mise au point de techniques de coculture en présence de macrophages dérivés de monocytes différenciés en présence ou en absence d'IL-34. Cela aiderait à comprendre par quels mécanismes les cellules β et les macrophages communiquent, le rôle de l'IL-34 dans ce dialogue et les conséquences sur la sécrétion d'insuline en conditions de stress (glucolipototoxicité et inflammation). L'ajout d'IL-34 exogène confirmerait son effet modulateur pendant l'inflammation et donc sur la sécrétion d'insuline par les cellules β . De plus, une coculture physique des deux types cellulaires ou en transwell ne permettant le passage que des facteurs solubles, permettra de comprendre les niveaux d'interactions nécessaires entre les cellules β et les macrophages dans les îlots de Langerhans.

Si les résultats ne démontrent pas que le phénotype observé chez les souris IL-34 ^{Δ Pdx} en condition inflammatoire implique une action de l'IL-34 sur les macrophages qui eux-mêmes favorisent ensuite les désordres métaboliques, il n'est pas exclu que la cytokine puisse agir de façon autocrine sur les cellules β productrices. En effet, PTP ζ a été identifié comme un second récepteur pour l'IL-34 et SDC1 comme un corécepteur de CD115 pouvant interagir avec la cytokine (Nandi et al., 2013; Segaliny et al., 2015). Il serait donc intéressant tout d'abord de vérifier l'expression protéique et transcriptionnelle de ces derniers dans les îlots de Langerhans murins et en particulier par les cellules β . Si l'un ou les deux récepteurs de l'IL-34 sont exprimés dans les îlots, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques les ciblant permettra d'observer l'impact de la fixation de l'IL-34 sur ces récepteurs sur la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans.

Enfin, pour attester du rôle immunorégulateur de l'IL-34 dans les îlots de Langerhans, il serait intéressant de mettre en place un protocole d'injection de la cytokine dans le modèle de souris IL-34 ^{Δ Pdx} en condition inflammatoire. Après la mise en place d'un régime HFD et l'apparition des premiers signes de diminution de tolérance au glucose, d'augmentation de la glycémie à jeun et de marqueur inflammatoires, l'injection d'IL-34 chez les souris permettrait d'évaluer si son action retarde le développement de l'inflammation chronique notamment dans les îlots pancréatiques. Aussi, la neutralisation de l'IL-34 par des injections intra-pancréatiques d'un anticorps spécifique (Obst et al., 2020) chez les souris contrôles donnerait une confirmation de son rôle de modulateur de l'inflammation au niveau des îlots de Langerhans.

Les résultats de ces prochains travaux permettront de comprendre plus finement les mécanismes d'action dans le pancréas de l'IL-34 au niveau immunitaire et métabolique.

Références bibliographiques

- Abbas, A.K., 2022. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, 6th ed.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Shiv Pillai, n.d. Cellular and Molecular Immunology, Elsevier. ed.
- Ahmed, B., Sultana, R., Greene, M.W., 2021. Adipose tissue and insulin resistance in obese. *Biomed. Pharmacother.* *Biomedecine Pharmacother.* **137**, 111315. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111315>
- Alonso, L.C., Yokoe, T., Zhang, P., Scott, D.K., Kim, S.K., O'Donnell, C.P., Garcia-Ocaña, A., 2007. Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication. *Diabetes* **56**, 1792–1801. <https://doi.org/10.2337/db06-1513>
- Andrali, S.S., Sampley, M.L., Vanderford, N.L., Ozcan, S., 2008. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem. J.* **415**, 1–10. <https://doi.org/10.1042/BJ20081029>
- Apovian, C.M., 2016. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am. J. Manag. Care* **22**, s176-185.
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2014. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* **5**.
- Areschoug, T., Gordon, S., 2009. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **11**, 1160–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01326.x>
- Baek, J.-H., Zeng, R., Weinmann-Menke, J., Valerius, M.T., Wada, Y., Ajay, A.K., Colonna, M., Kelley, V.R., 2015. IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease. *J. Clin. Invest.* **125**, 3198–3214. <https://doi.org/10.1172/JCI81166>
- Baghdadi, M., Endo, H., Tanaka, Y., Wada, H., Seino, K.-I., 2017. Interleukin 34, from pathogenesis to clinical applications. *Cytokine* **99**, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.08.020>
- Baghdadi, M., Umeyama, Y., Hama, N., Kobayashi, T., Han, N., Wada, H., Seino, K.-I., 2018. Interleukin-34, a comprehensive review. *J. Leukoc. Biol.* **104**, 931–951. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR1117-457R>
- Baghdadi, M., Wada, H., Nakanishi, S., Abe, H., Han, N., Putra, W.E., Endo, D., Watari, H., Sakuragi, N., Hida, Y., Kaga, K., Miyagi, Y., Yokose, T., Takano, A., Daigo, Y., Seino, K.-I., 2016. Chemotherapy-Induced IL34 Enhances Immunosuppression by Tumor-Associated Macrophages and Mediates Survival of Chemoresistant Lung Cancer Cells. *Cancer Res.* **76**, 6030–6042. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1170>

- Banaei-Bouchareb, L., Gouon-Evans, V., Samara-Boustani, D., Castellotti, M.C., Czernichow, P., Pollard, J.W., Polak, M., 2004. Insulin cell mass is altered in *Csf1op/Csf1op* macrophage-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.* 76, 359–367. <https://doi.org/10.1189/jlb.1103591>
- Barilla, S., Treuter, E., Venteclef, N., 2021. Transcriptional and epigenetic control of adipocyte remodeling during obesity. *Obes. Silver Spring Md* 29, 2013–2025. <https://doi.org/10.1002/oby.23248>
- Barve, R.A., Zack, M.D., Weiss, D., Song, R.-H., Beidler, D., Head, R.D., 2013. Transcriptional profiling and pathway analysis of CSF-1 and IL-34 effects on human monocyte differentiation. *Cytokine* 63, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.04.019>
- Baud'Huin, M., Renault, R., Charrier, C., Riet, A., Moreau, A., Brion, R., Gouin, F., Duplomb, L., Heymann, D., 2010. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis: IL-34 expression in giant cell tumours: role in osteoclastogenesis. *J. Pathol.* 221, 77–86. <https://doi.org/10.1002/path.2684>
- Below, J.E., Gamazon, E.R., Morrison, J.V., Konkashbaev, A., Pluzhnikov, A., McKeigue, P.M., Parra, E.J., Elbein, S.C., Hallman, D.M., Nicolae, D.L., Bell, G.I., Cruz, M., Cox, N.J., Hanis, C.L., 2011. Genome-wide association and meta-analysis in populations from Starr County, Texas, and Mexico City identify type 2 diabetes susceptibility loci and enrichment for expression quantitative trait loci in top signals. *Diabetologia* 54, 2047–2055. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2188-3>
- Bézie, S., Freuchet, A., Sérazin, C., Salama, A., Vimond, N., Anegon, I., Guillonneau, C., 2020. IL-34 Actions on FOXP3+ Tregs and CD14+ Monocytes Control Human Graft Rejection. *Front. Immunol.* 11, 1496. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01496>
- Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., Guillonneau, C., 2015. IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J. Clin. Invest.* 125, 3952–3964. <https://doi.org/10.1172/JCI81227>
- Blanden, R.V., Lefford, M.J., Mackaness, G.B., 1969. The host response to Calmette-Guérin bacillus infection in mice. *J. Exp. Med.* 129, 1079–1107. <https://doi.org/10.1084/jem.129.5.1079>
- Boada-Romero, E., Martinez, J., Heckmann, B.L., Green, D.R., 2020. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 398–414. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0232-1>
- Böni-Schnetzler, M., Boller, S., Debray, S., Bouzakri, K., Meier, D.T., Prazak, R., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Ehses, J.A., Schuit, F.C., Donath, M.Y., 2009. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology* 150, 5218–5229. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0543>

- Booker, B.E., Clark, R.S., Pellom, S.T., Adunyah, S.E., 2015. Interleukin-34 induces monocytic-like differentiation in leukemia cell lines. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 6, 1–16.
- Boström, E.A., Lundberg, P., 2013. The Newly Discovered Cytokine IL-34 Is Expressed in Gingival Fibroblasts, Shows Enhanced Expression by Pro-Inflammatory Cytokines, and Stimulates Osteoclast Differentiation. *PLoS ONE* 8, e81665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081665>
- Boulakirba, S., Pfeifer, A., Mhaidly, R., Obba, S., Goulard, M., Schmitt, T., Chaintreuil, P., Calleja, A., Furstoss, N., Orange, F., Lacas-Gervais, S., Boyer, L., Marchetti, S., Verhoeyen, E., Luciano, F., Robert, G., Auberger, P., Jacquelin, A., 2018. IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential. *Sci. Rep.* 8, 256. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18433-4>
- Braga, T.T., Agudelo, J.S.H., Camara, N.O.S., 2015. Macrophages During the Fibrotic Process: M2 as Friend and Foe. *Front. Immunol.* 6.
- Butcher, M.J., Hallinger, D., Garcia, E., Machida, Y., Chakrabarti, S., Nadler, J., Galkina, E.V., Imai, Y., 2014. Association of proinflammatory cytokines and islet resident leucocytes with islet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetologia* 57, 491–501. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3116-5>
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.102>
- Calderon, B., Carrero, J.A., Ferris, S.T., Sojka, D.K., Moore, L., Epelman, S., Murphy, K.M., Yokoyama, W.M., Randolph, G.J., Unanue, E.R., 2015. The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. *J. Exp. Med.* 212, 1497–1512. <https://doi.org/10.1084/jem.20150496>
- Carcelin, G., n.d. Immunologie fondamentale et immunopathologie [WWW Document]. URL (accessed 4.6.23).
- Caslin, H.L., Bhanot, M., Bolus, W.R., Hasty, A.H., 2020. Adipose tissue macrophages: Unique polarization and bioenergetics in obesity. *Immunol. Rev.* 295, 101–113. <https://doi.org/10.1111/imr.12853>
- Chang, E.-J., Lee, S.K., Song, Y.S., Jang, Y.J., Park, H.S., Hong, J.P., Ko, A.R., Kim, D.Y., Kim, J.-H., Lee, Y.J., Heo, Y.-S., 2014. IL-34 is associated with obesity, chronic inflammation, and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E1263-1271. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-4409>
- Chang, S.H., Choi, B.Y., Choi, J., Yoo, J.J., Ha, Y.-J., Cho, H.J., Kang, E.H., Song, Y.W., Lee, Y.J., 2015. Baseline serum interleukin-34 levels independently predict radiographic progression in

- patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 35, 71–79. <https://doi.org/10.1007/s00296-014-3056-5>
- Chemel, M., Le Goff, B., Brion, R., Cozic, C., Berreur, M., Amiaud, J., Bougras, G., Touchais, S., Blanchard, F., Heymann, M.F., Berthelot, J.M., Verrecchia, F., Heymann, D., 2012. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 150–154. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200096>
- Cheng, S.-T., Tang, H., Ren, J.-H., Chen, X., Huang, A.-L., Chen, J., 2017. Interleukin-34 inhibits hepatitis B virus replication in vitro and in vivo. *PloS One* 12, e0179605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179605>
- Chihara, T., Suzu, S., Hassan, R., Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Motoyoshi, K., Kimura, F., Okada, S., 2010. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* 17, 1917–1927. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.60>
- Christofides, A., Strauss, L., Yeo, A., Cao, C., Charest, A., Boussiotis, V.A., 2022. The complex role of tumor-infiltrating macrophages. *Nat. Immunol.* 23, 1148–1156. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01267-2>
- Ciccia, F., Alessandro, R., Rodolico, V., Guggino, G., Raimondo, S., Guarnotta, C., Giardina, A., Sireci, G., Campisi, G., De Leo, G., Triolo, G., 2013. IL-34 is overexpressed in the inflamed salivary glands of patients with Sjogren’s syndrome and is associated with the local expansion of pro-inflammatory CD14(bright)CD16+ monocytes. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 52, 1009–1017. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes435>
- Comazzetto, S., Shen, B., Morrison, S.J., 2021. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Dev. Cell* 56, 1848–1860. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.05.018>
- Corwin, E.J., 2000. Understanding cytokines. Part I: Physiology and mechanism of action. *Biol. Res. Nurs.* 2, 30–40. <https://doi.org/10.1177/109980040000200104>
- Cosentino, C., Regazzi, R., 2021. Crosstalk between Macrophages and Pancreatic β -Cells in Islet Development, Homeostasis and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22041765>
- Covalada, L., Fuller, F.J., Payne, S.L., 2010. EIAV S2 enhances pro-inflammatory cytokine and chemokine response in infected macrophages. *Virology* 397, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.11.005>
- Criscimanna, A., Coudriet, G.M., Gittes, G.K., Piganelli, J.D., Esni, F., 2014. Activated macrophages create lineage-specific microenvironments for pancreatic acinar- and β -cell regeneration in mice. *Gastroenterology* 147, 1106–1118.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.08.008>

- Cucak, H., Grunnet, L.G., Rosendahl, A., 2014. Accumulation of M1-like macrophages in type 2 diabetic islets is followed by a systemic shift in macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* 95, 149–160. <https://doi.org/10.1189/jlb.0213075>
- Dai, X.-M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., Stanley, E.R., 2002. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111–120. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.1.111>
- De Meyts, P., 2000. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network, in: Feingold, K.R., Anawalt, B., Blackman, M.R., Boyce, A., Chrousos, G., Corpas, E., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Kapoor, N., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C.S., Kuohung, W., Laferrère, B., Levy, M., McGee, E.A., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Shah, A.S., Singer, F., Sperling, M.A., Stratakis, C.A., Trencé, D.L., Wilson, D.P. (Eds.), Endotext. MDTText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- De Tata, V., 2014. Age-related impairment of pancreatic Beta-cell function: pathophysiological and cellular mechanisms. *Front. Endocrinol.* 5, 138. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00138>
- Deban, L., Bottazzi, B., Garlanda, C., de la Torre, Y.M., Mantovani, A., 2009. Pentraxins: multifunctional proteins at the interface of innate immunity and inflammation. *BioFactors Oxf. Engl.* 35, 138–145. <https://doi.org/10.1002/biof.21>
- Dolenšek, J., Rupnik, M.S., Stožer, A., 2015. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 7, e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Domínguez-Andrés, J., Dos Santos, J.C., Bekkering, S., Mulder, W.J.M., van der Meer, J.W.M., Riksen, N.P., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., 2023. Trained immunity: adaptation within innate immune mechanisms. *Physiol. Rev.* 103, 313–346. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2021>
- Dror, E., Dalmás, E., Meier, D.T., Wueest, S., Thévenet, J., Thienel, C., Timper, K., Nordmann, T.M., Traub, S., Schulze, F., Item, F., Vallois, D., Pattou, F., Kerr-Conte, J., Lavallard, V., Berney, T., Thorens, B., Konrad, D., Böni-Schnetzler, M., Donath, M.Y., 2017. Postprandial macrophage-derived IL-1 β stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation. *Nat. Immunol.* 18, 283–292. <https://doi.org/10.1038/ni.3659>
- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H.Y., Wang, R.-F., 2022. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front. Immunol.* 13, 812774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>
- Ebrahim, N., Shakirova, K., Dashinimaev, E., 2022. PDX1 is the cornerstone of pancreatic β -cell functions and identity. *Front. Mol. Biosci.* 9.

- Eguchi, K., Manabe, I., Oishi-Tanaka, Y., Ohsugi, M., Kono, N., Ogata, F., Yagi, N., Ohto, U., Kimoto, M., Miyake, K., Tobe, K., Arai, H., Kadowaki, T., Nagai, R., 2012. Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab.* 15, 518–533. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.023>
- Ehses, J.A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J.A., Maor-Cahn, R., Gueripel, X., Ellingsgaard, H., Schneider, M.K.J., Biollaz, G., Fontana, A., Reinecke, M., Homo-Delarche, F., Donath, M.Y., 2007. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetes* 56, 2356–2370. <https://doi.org/10.2337/db06-1650>
- Endo, H., Hama, N., Baghdadi, M., Ishikawa, K., Otsuka, R., Wada, H., Asano, H., Endo, D., Konno, Y., Kato, T., Watari, H., Tozawa, A., Suzuki, N., Yokose, T., Takano, A., Kato, H., Miyagi, Y., Daigo, Y., Seino, K.-I., 2020. Interleukin-34 expression in ovarian cancer: a possible correlation with disease progression. *Int. Immunol.* 32, 175–186. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz074>
- Endo, Y., Matsushita, M., Fujita, T., 2007. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunobiology* 212, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2006.11.014>
- Epelman, S., Lavine, K.J., Randolph, G.J., 2014. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* 41, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Fan, X., Rudensky, A.Y., 2016. Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell* 164, 1198–1211. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.048>
- Fasshauer, M., Blüher, M., 2015. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014>
- Felix, J., Elegheert, J., Gutsche, I., Shkumatov, A.V., Wen, Y., Bracke, N., Pannecoucke, E., Vandenberghe, I., Devreese, B., Svergun, D.I., Pauwels, E., Vergauwen, B., Savvides, S.N., 2013. Human IL-34 and CSF-1 establish structurally similar extracellular assemblies with their common hematopoietic receptor. *Struct. Lond. Engl.* 1993 21, 528–539. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.01.018>
- Forbes, B.E., 2023. The three-dimensional structure of insulin and its receptor. *Vitam. Horm.* 123, 151–185. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.12.001>
- Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Descamps, P., Ifrah, N., Delneste, Y., Jeannin, P., 2015. IL-34 and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1 α . *Eur. J. Immunol.* 45, 1092–1102. <https://doi.org/10.1002/eji.201444606>
- Foucher, E.D., Blanchard, S., Preisser, L., Garo, E., Ifrah, N., Guardiola, P., Delneste, Y., Jeannin, P., 2013. IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PloS One* 8, e56045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056045>

- Franzè, E., Dinallo, V., Laudisi, F., Di Grazia, A., Di Fusco, D., Colantoni, A., Ortenzi, A., Giuffrida, P., Di Carlo, S., Sica, G.S., Di Sabatino, A., Monteleone, G., 2020a. Interleukin-34 Stimulates Gut Fibroblasts to Produce Collagen Synthesis. *J. Crohns Colitis* 14, 1436–1445. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjaa073>
- Franzè, E., Dinallo, V., Rizzo, A., Di Giovangiulio, M., Bevivino, G., Stolfi, C., Caprioli, F., Colantoni, A., Ortenzi, A., Grazia, A.D., Sica, G., Sileri, P.P., Rossi, P., Monteleone, G., 2018. Interleukin-34 sustains pro-tumorigenic signals in colon cancer tissue. *Oncotarget* 9, 3432–3445. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23289>
- Franzè, E., Marafini, I., De Simone, V., Monteleone, I., Caprioli, F., Colantoni, A., Ortenzi, A., Crescenzi, F., Izzo, R., Sica, G., Sileri, P., Rossi, P., Pallone, F., Monteleone, G., 2016. Interleukin-34 Induces Cc-chemokine Ligand 20 in Gut Epithelial Cells. *J. Crohns Colitis* 10, 87–94. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv181>
- Franzè, E., Monteleone, I., Cupi, M.L., Mancia, P., Caprioli, F., Marafini, I., Colantoni, A., Ortenzi, A., Laudisi, F., Sica, G., Sileri, P., Pallone, F., Monteleone, G., 2015. Interleukin-34 sustains inflammatory pathways in the gut. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 129, 271–280. <https://doi.org/10.1042/CS20150132>
- Franzè, E., Stolfi, C., Troncone, E., Scarozza, P., Monteleone, G., 2020b. Role of Interleukin-34 in Cancer. *Cancers* 12, 252. <https://doi.org/10.3390/cancers12010252>
- Freuchet, A., Salama, A., Bézie, S., Tesson, L., Rémy, S., Humeau, R., Règue, H., Sérazin, C., Flippe, L., Peterson, P., Vimond, N., Usal, C., Ménoret, S., Heslan, J.-M., Duteille, F., Blanchard, F., Giral, M., Colonna, M., Anegon, I., Guillonneau, C., 2022. IL-34 deficiency impairs FOXP3+ Treg function in a model of autoimmune colitis and decreases immune tolerance homeostasis. *Clin. Transl. Med.* 12, e988. <https://doi.org/10.1002/ctm2.988>
- Freuchet, A., Salama, A., Remy, S., Guillonneau, C., Anegon, I., 2021. IL-34 and CSF-1, deciphering similarities and differences at steady state and in diseases. *J. Leukoc. Biol.* 110, 771–796. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1120-773R>
- Fu, C., Zhou, L., Mi, Q.-S., Jiang, A., 2022. Plasmacytoid Dendritic Cells and Cancer Immunotherapy. *Cells* 11, 222. <https://doi.org/10.3390/cells11020222>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K.B., Ostolaza, H., Martín, C., 2020. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Gao, D., Jiao, J., Wang, Z., Huang, X., Ni, X., Fang, S., Zhou, Q., Zhu, X., Sun, L., Yang, Z., Yuan, H., 2022. The roles of cell-cell and organ-organ crosstalk in the type 2 diabetes mellitus associated inflammatory microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 66, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2022.04.002>

- Gerngross, L., Fischer, T., 2015. Evidence for cFMS signaling in HIV production by brain macrophages and microglia. *J. Neurovirol.* 21, 249–256. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0270-6>
- Gerngross, L., Lehmicke, G., Belkadi, A., Fischer, T., 2015. Role for cFMS in maintaining alternative macrophage polarization in SIV infection: implications for HIV neuropathogenesis. *J. Neuroinflammation* 12, 58. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0272-1>
- Geutskens, S.B., Otonkoski, T., Pulkkinen, M.-A., Drexhage, H.A., Leenen, P.J.M., 2005. Macrophages in the murine pancreas and their involvement in fetal endocrine development in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 78, 845–852. <https://doi.org/10.1189/jlb.1004624>
- Ginhoux, F., Williams, M., 2016. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- Ginhoux, F., Jung, S., 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Gordon, S., 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1, S9-17. <https://doi.org/10.1002/eji.200737638>
- Grayfer, L., Robert, J., 2015. Distinct functional roles of amphibian (*Xenopus laevis*) colony-stimulating factor-1- and interleukin-34-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 98, 641–649. <https://doi.org/10.1189/jlb.4AB0315-117RR>
- Grayfer, L., Robert, J., 2014. Divergent antiviral roles of amphibian (*Xenopus laevis*) macrophages elicited by colony-stimulating factor-1 and interleukin-34. *J. Leukoc. Biol.* 96, 1143–1153. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0614-295R>
- Gregg, T., Poudel, C., Schmidt, B.A., Dhillon, R.S., Sdao, S.M., Truchan, N.A., Baar, E.L., Fernandez, L.A., Denu, J.M., Eliceiri, K.W., Rogers, J.D., Kimple, M.E., Lamming, D.W., Merrins, M.J., 2016. Pancreatic β -Cells From Mice Offset Age-Associated Mitochondrial Deficiency With Reduced KATP Channel Activity. *Diabetes* 65, 2700–2710. <https://doi.org/10.2337/db16-0432>
- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., Becher, B., 2012. Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* 37, 1050–1060. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.001>
- Gupta, D., Jetton, T.L., LaRock, K., Monga, N., Satish, B., Lausier, J., Peshavaria, M., Leahy, J.L., 2017. Temporal characterization of β cell-adaptive and -maladaptive mechanisms during chronic high-fat feeding in C57BL/6NTac mice. *J. Biol. Chem.* 292, 12449–12459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781047>
- Gupta, G., Surolia, A., 2007. Collectins: sentinels of innate immunity. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 29, 452–464. <https://doi.org/10.1002/bies.20573>

- Haeusler, R.A., McGraw, T.E., Accili, D., 2018. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M., 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>
- Henry, B.M., Skinningsrud, B., Saganiak, K., Pękala, P.A., Walocha, J.A., Tomaszewski, K.A., 2019. Development of the human pancreas and its vasculature - An integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* 221, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.09.008>
- Hill, D.A., Lim, H.-W., Kim, Y.H., Ho, W.Y., Foong, Y.H., Nelson, V.L., Nguyen, H.C.B., Chegiredy, K., Kim, J., Habertheuer, A., Vallabhajosyula, P., Kambayashi, T., Won, K.-J., Lazar, M.A., 2018. Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E5096–E5105. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802611115>
- Hotamisligil, G.S., 2017. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature* 542, 177–185. <https://doi.org/10.1038/nature21363>
- Hull, R.L., Kodama, K., Utschneider, K.M., Carr, D.B., Prigeon, R.L., Kahn, S.E., 2005. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48, 1350–1358. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1772-9>
- Igoillo-Esteve, M., Marselli, L., Cunha, D.A., Ladrière, L., Ortis, F., Grieco, F.A., Dotta, F., Weir, G.C., Marchetti, P., Eizirik, D.L., Cnop, M., 2010. Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. *Diabetologia* 53, 1395–1405. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1707-y>
- Irwin, D.M., 2021. Evolution of the Insulin Gene: Changes in Gene Number, Sequence, and Processing. *Front. Endocrinol.* 12, 649255. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.649255>
- Jennings, R.E., Berry, A.A., Strutt, J.P., Gerrard, D.T., Hanley, N.A., 2015. Human pancreas development. *Dev. Camb. Engl.* 142, 3126–3137. <https://doi.org/10.1242/dev.120063>
- Jin, S., Sonobe, Y., Kawanokuchi, J., Horiuchi, H., Cheng, Y., Wang, Y., Mizuno, T., Takeuchi, H., Suzumura, A., 2014. Interleukin-34 Restores Blood–Brain Barrier Integrity by Upregulating Tight Junction Proteins in Endothelial Cells. *PLoS ONE* 9, e115981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115981>
- Johnson, A.M.F., Olefsky, J.M., 2013. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell* 152, 673–684. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.041>

- Kajihara, N., Kitagawa, F., Kobayashi, T., Wada, H., Otsuka, R., Seino, K.-I., 2020. Interleukin-34 contributes to poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* 27, 1198–1204. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01123-x>
- Kamata, K., Mizukami, H., Inaba, W., Tsuboi, K., Tateishi, Y., Yoshida, T., Yagihashi, S., 2014. Islet amyloid with macrophage migration correlates with augmented β -cell deficits in type 2 diabetic patients. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* 21, 191–201. <https://doi.org/10.3109/13506129.2014.937857>
- Kawai, T., Autieri, M.V., Scalia, R., 2021. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 320, C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>
- Khoshnan, A., Sabbaugh, A., Calamini, B., Marinero, S.A., Dunn, D.E., Yoo, J.H., Ko, J., Lo, D.C., Patterson, P.H., 2017. IKK β and mutant huntingtin interactions regulate the expression of IL-34: implications for microglial-mediated neurodegeneration in HD. *Hum. Mol. Genet.* 26, 4267–4277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx315>
- Kleinnijenhuis, J., Quintin, J., Preijers, F., Joosten, L.A.B., Ifrim, D.C., Saeed, S., Jacobs, C., van Loenhout, J., de Jong, D., Stunnenberg, H.G., Xavier, R.J., van der Meer, J.W.M., van Crevel, R., Netea, M.G., 2012. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17537–17542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109>
- Kratofil, R.M., Kubes, P., Deniset, J.F., 2017. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 35–42. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308198>
- Krenkel, O., Tacke, F., 2017. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 306–321. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>
- Lech, M., Anders, H.-J., 2013. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Fibrosis: Translation of basic research to human disease* 1832, 989–997. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.001>
- Lelios, I., Cansever, D., Utz, S.G., Mildenerberger, W., Stifter, S.A., Greter, M., 2020. Emerging roles of IL-34 in health and disease. *J. Exp. Med.* 217, e20190290. <https://doi.org/10.1084/jem.20190290>
- Li, D., Wu, M., 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>
- Liao, L.-N., Chen, C.-C., Wu, F.-Y., Lin, C.-C., Hsiao, J.-H., Chang, C.-T., Kardia, S.L.R., Li, T.-C., Tsai, F.-J., 2014. Identified single-nucleotide polymorphisms and haplotypes at 16q22.1 increase diabetic nephropathy risk in Han Chinese population. *BMC Genet.* 15, 113. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0113-8>

- Liew, P.X., Kubes, P., 2019. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol. Rev.* 99, 1223–1248. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>
- Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Halenbeck, R., Wu, G., Zhou, A., Behrens, D., Hollenbaugh, D., Linnemann, T., Qin, M., Wong, J., Chu, K., Doberstein, S.K., Williams, L.T., 2008. Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science* 320, 807–811. <https://doi.org/10.1126/science.1154370>
- Lin, K., Ma, J., Peng, Y., Sun, M., Xu, K., Wu, R., Lin, J., 2019. Autocrine Production of Interleukin-34 Promotes the Development of Endometriosis through CSF1R/JAK3/STAT6 signaling. *Sci. Rep.* 9, 16781. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52741-1>
- Lin, X., Luo, H., Yan, X., Song, Z., Gao, X., Xia, Y., Zhang, L., Yin, Y., Cao, J., 2018. Interleukin-34 Ameliorates Survival and Bacterial Clearance in Polymicrobial Sepsis. *Crit. Care Med.* 46, e584–e590. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003017>
- Lindau, R., Mehta, R.B., Lash, G.E., Papapavlou, G., Boij, R., Berg, G., Jenmalm, M.C., Ernerudh, J., Svensson-Arvelund, J., 2018. Interleukin-34 is present at the fetal-maternal interface and induces immunoregulatory macrophages of a decidual phenotype in vitro. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 33, 588–599. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey037>
- Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H.A., Liu, G., 2021. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurt. Ger.* 8, e2004433. <https://doi.org/10.1002/advs.202004433>
- Liu, H., Leo, C., Chen, X., Wong, B.R., Williams, L.T., Lin, H., He, X., 2012. The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.04.012>
- Lobo, N., Brooks, N.A., Zlotta, A.R., Cirillo, J.D., Boorjian, S., Black, P.C., Meeks, J.J., Bivalacqua, T.J., Gontero, P., Steinberg, G.D., McConkey, D., Babjuk, M., Alfred Witjes, J., Kamat, A.M., 2021. 100 years of Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy: from cattle to COVID-19. *Nat. Rev. Urol.* 18, 611–622. <https://doi.org/10.1038/s41585-021-00481-1>
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G., 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Luci, C., Tomasello, E., 2008. Natural killer cells: detectors of stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2335–2340. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.05.001>
- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., Saltiel, A.R., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117, 175–184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>
- Luo, L., Liu, M., 2016. Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* 231, R77–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>

- Ma, D., Doi, Y., Jin, S., Li, E., Sonobe, Y., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2012. TGF- β induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity. *Neurosci. Lett.* 529, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.08.071>
- Ma, X., Lin, W.Y., Chen, Y., Stawicki, S., Mukhyala, K., Wu, Y., Martin, F., Bazan, J.F., Starovasnik, M.A., 2012. Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Struct. Lond. Engl.* 1993 20, 676–687. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.02.010>
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., Donath, M.Y., 2002. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 110, 851–860. <https://doi.org/10.1172/JCI15318>
- Magnuson, M.A., Osipovich, A.B., 2013. Pancreas-specific Cre driver lines and considerations for their prudent use. *Cell Metab.* 18, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.011>
- Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F., Garlanda, C., 2022. Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21, 799–820. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00520-5>
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>
- Masteller, E.L., Wong, B.R., 2014. Targeting IL-34 in chronic inflammation. *Drug Discov. Today* 19, 1212–1216. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.05.016>
- Masters, S.L., Dunne, A., Subramanian, S.L., Hull, R.L., Tannahill, G.M., Sharp, F.A., Becker, C., Franchi, L., Yoshihara, E., Chen, Z., Mullooly, N., Mielke, L.A., Harris, J., Coll, R.C., Mills, K.H.G., Mok, K.H., Newsholme, P., Nuñez, G., Yodoi, J., Kahn, S.E., Lavelle, E.C., O’Neill, L.A.J., 2010. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.* 11, 897–904. <https://doi.org/10.1038/ni.1935>
- Medzhitov, R., 2010. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* 140, 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826. <https://doi.org/10.1038/nature06246>
- Mellman, I., 2013. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol. Res.* 1, 145–149. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0102>

- Miyake, K., Shibata, S., Yoshikawa, S., Karasuyama, H., 2021. Basophils and their effector molecules in allergic disorders. *Allergy* 76, 1693–1706. <https://doi.org/10.1111/all.14662>
- Mizuno, T., Doi, Y., Mizoguchi, H., Jin, S., Noda, M., Sonobe, Y., Takeuchi, H., Suzumura, A., 2011. Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity. *Am. J. Pathol.* 179, 2016–2027. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.011>
- Monga, I., Kaur, K., Dhanda, S.K., 2022. Revisiting hematopoiesis: applications of the bulk and single-cell transcriptomics dissecting transcriptional heterogeneity in hematopoietic stem cells. *Brief. Funct. Genomics* 21, 159–176. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elac002>
- Monnier, M., Paolini, L., Vinatier, E., Mantovani, A., Delneste, Y., Jeannin, P., 2022. Antitumor strategies targeting macrophages: the importance of considering the differences in differentiation/polarization processes between human and mouse macrophages. *J. Immunother. Cancer* 10, e005560. <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-005560>
- Moon, S.-J., Hong, Y.-S., Ju, J.H., Kwok, S.-K., Park, S.-H., Min, J.-K., 2013. Increased Levels of Interleukin 34 in Serum and Synovial Fluid Are Associated with Rheumatoid Factor and Anticyclic Citrullinated Peptide Antibody Titers in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 40, 1842–1849. <https://doi.org/10.3899/jrheum.130356>
- Moreno, S.G., 2018. Depleting Macrophages In Vivo with Clodronate-Liposomes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1784, 259–262. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_23
- Morigny, P., Boucher, J., Arner, P., Langin, D., 2021. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. *Nat. Rev. Endocrinol.* 17, 276–295. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00471-8>
- Morioka, S., Maueröder, C., Ravichandran, K.S., 2019. Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology. *Immunity* 50, 1149–1162. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.018>
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mostafa, T.M., El-Gharbawy, N.M., Werida, R.H., 2021. Circulating IRAPe, Irisin, and IL-34 in Relation to Insulin Resistance in Patients With Type 2 Diabetes. *Clin. Ther.* 43, e230–e240. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.05.003>
- Muñoz-García, J., Cochonneau, D., Télétchéa, S., Moranton, E., Lanoe, D., Brion, R., Lézot, F., Heymann, M.-F., Heymann, D., 2021. The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis. *Theranostics* 11, 1568–1593. <https://doi.org/10.7150/thno.50683>

- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–737. <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Murugaiah, V., Tsolaki, A.G., Kishore, U., 2020. Collectins: Innate Immune Pattern Recognition Molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1204, 75–127. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1580-4_4
- Nagata, S., 2018. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 489–517. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>
- Nakamichi, Y., Mizoguchi, T., Arai, A., Kobayashi, Y., Sato, M., Penninger, J.M., Yasuda, H., Kato, S., DeLuca, H.F., Suda, T., Udagawa, N., Takahashi, N., 2012. Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10006–10011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207361109>
- Nakamichi, Y., Udagawa, N., Takahashi, N., 2013. IL-34 and CSF-1: similarities and differences. *J. Bone Miner. Metab.* 31, 486–495. <https://doi.org/10.1007/s00774-013-0476-3>
- Nandi, S., Cioce, M., Yeung, Y.-G., Nieves, E., Tesfa, L., Lin, H., Hsu, A.W., Halenbeck, R., Cheng, H.-Y., Gokhan, S., Mehler, M.F., Stanley, E.R., 2013. Receptor-type Protein-tyrosine Phosphatase ζ Is a Functional Receptor for Interleukin-34. *J. Biol. Chem.* 288, 21972–21986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.442731>
- Netea, M.G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L.B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L.A.B., van der Meer, J.W.M., Mhlanga, M.M., Mulder, W.J.M., Riksen, N.P., Schlitzer, A., Schultze, J.L., Stabell Benn, C., Sun, J.C., Xavier, R.J., Latz, E., 2020. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 375–388. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6>
- Nguipodop-Djomo, P., Heldal, E., Rodrigues, L.C., Abubakar, I., Mangtani, P., 2016. BCG vaccination: a long-lasting protection against tuberculosis?--Authors' reply. *Lancet Infect. Dis.* 16, 408–409. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00134-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00134-1)
- Obst, J., Simon, E., Martin-Estebane, M., Pippi, E., Barkwill, L.M., Gonzalez-Rivera, I., Buchanan, F., Prescott, A.R., Faust, D., Fox, S., Brownlees, J., Taylor, D., Perry, V.H., Nuthall, H., Atkinson, P.J., Karran, E., Routledge, C., Gomez-Nicola, D., 2020. Inhibition of IL-34 Unveils Tissue-Selectivity and Is Sufficient to Reduce Microglial Proliferation in a Model of Chronic Neurodegeneration. *Front. Immunol.* 11, 579000. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.579000>
- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., Chawla, A., 2007. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120. <https://doi.org/10.1038/nature05894>
- Ohgidani, M., Kato, T.A., Setoyama, D., Sagata, N., Hashimoto, R., Shigenobu, K., Yoshida, T., Hayakawa, K., Shimokawa, N., Miura, D., Utsumi, H., Kanba, S., 2014. Direct induction of ramified

- microglia-like cells from human monocytes: dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease. *Sci. Rep.* 4, 4957. <https://doi.org/10.1038/srep04957>
- Opal, S.M., DePalo, V.A., 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117, 1162–1172. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
- Orliaguet, L., Dalmas, E., Drareni, K., Venteclef, N., Alzaid, F., 2020. Mechanisms of Macrophage Polarization in Insulin Signaling and Sensitivity. *Front. Endocrinol.* 11, 62. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00062>
- Ouyang, W., O'Garra, A., 2019. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* 50, 871–891. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.020>
- Parkin, J., Cohen, B., 2001. An overview of the immune system. *Lancet Lond. Engl.* 357, 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Pasquier, A., 2016. Lysosomal degradation of insulin granules promotes β -cell failure in type 2 diabetes (phdthesis). Université de Strasbourg.
- Piao, C., Wang, X., Peng, S., Guo, X., Zhao, H., He, L., Zeng, Y., Zhang, F., Zhu, K., Wang, Y., 2019. IL-34 causes inflammation and beta cell apoptosis and dysfunction in gestational diabetes mellitus. *Endocr. Connect.* 8, 1503–1512. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0436>
- Poudel, M., Kim, G., Bhattarai, P.Y., Kim, J.-Y., Choi, H.S., 2021. Interleukin-34-CSF1R Signaling Axis Promotes Epithelial Cell Transformation and Breast Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2711. <https://doi.org/10.3390/ijms22052711>
- Prattichizzo, F., De Nigris, V., Spiga, R., Mancuso, E., La Sala, L., Antonicelli, R., Testa, R., Procopio, A.D., Olivieri, F., Ceriello, A., 2018. Inflammageing and metaflammation: The yin and yang of type 2 diabetes. *Ageing Res. Rev.* 41, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.10.003>
- Preisser, L., Miot, C., Le Guillou-Guillemette, H., Beaumont, E., Foucher, E.D., Garo, E., Blanchard, S., Frémaux, I., Croué, A., Fouchard, I., Lunel-Fabiani, F., Boursier, J., Roingeard, P., Calès, P., Delneste, Y., Jeannin, P., 2014. IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology* 60, 1879–1890. <https://doi.org/10.1002/hep.27328>
- Rahman, M.S., Hossain, K.S., Das, S., Kundu, S., Adegoke, E.O., Rahman, M.A., Hannan, M.A., Uddin, M.J., Pang, M.-G., 2021. Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6403. <https://doi.org/10.3390/ijms22126403>
- Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., Scharfmann, R., 2011. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 121, 3589–3597. <https://doi.org/10.1172/JCI58447>

- Riley, K.G., Pasek, R.C., Maulis, M.F., Dunn, J.C., Bolus, W.R., Kendall, P.L., Hasty, A.H., Gannon, M., 2015. Macrophages are essential for CTGF-mediated adult β -cell proliferation after injury. *Mol. Metab.* 4, 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.05.002>
- Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y., Han, W., 2016. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 48, e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Rohm, T.V., Meier, D.T., Olefsky, J.M., Donath, M.Y., 2022. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. *Immunity* 55, 31–55. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.12.013>
- Rosales, C., Uribe-Querol, E., 2017. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Res. Int.* 2017, 9042851. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
- Ross, E.A., Devitt, A., Johnson, J.R., 2021. Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front. Immunol.* 12, 708186. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708186>
- Sachdeva, M.M., Stoffers, D.A., 2009. Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 23, 747–758. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0400>
- Saisho, Y., Butler, A.E., Manesso, E., Elashoff, D., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2013. β -cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care* 36, 111–117. <https://doi.org/10.2337/dc12-0421>
- Saltiel, A.R., 2021. Insulin signaling in health and disease. *J. Clin. Invest.* 131, e142241, 142241. <https://doi.org/10.1172/JCI142241>
- Santoro, A., Bientinesi, E., Monti, D., 2021. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res. Rev.* 71, 101422. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101422>
- Saraiva, M., Vieira, P., O’Garra, A., 2020. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* 217, e20190418. <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
- Segaliny, A.I., Brion, R., Mortier, E., Maillason, M., Cherel, M., Jacques, Y., Le Goff, B., Heymann, D., 2015. Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 1010–1021. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.023>
- Ségaly, A.I., Mohamadi, A., Dizier, B., Lokajczyk, A., Brion, R., Lanel, R., Amiaud, J., Charrier, C., Boisson-Vidal, C., Heymann, D., 2015. Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. *Int. J. Cancer* 137, 73–85. <https://doi.org/10.1002/ijc.29376>
- Segura, E., 2022. Human dendritic cell subsets: An updated view of their ontogeny and functional specialization. *Eur. J. Immunol.* 52, 1759–1767. <https://doi.org/10.1002/eji.202149632>
- Shabanpoor, F., Separovic, F., Wade, J.D., 2009. The human insulin superfamily of polypeptide hormones. *Vitam. Horm.* 80, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)00601-8](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)00601-8)

- Shamri, R., Xenakis, J.J., Spencer, L.A., 2011. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 343, 57–83. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1049-6>
- Shapiro, H., Lutaty, A., Ariel, A., 2011. Macrophages, Meta-Inflammation, and Immuno-Metabolism. *Sci. World J.* 11, 2509–2529. <https://doi.org/10.1100/2011/397971>
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A., 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Shoji, H., Yoshio, S., Mano, Y., Kumagai, E., Sugiyama, M., Korenaga, M., Arai, T., Itokawa, N., Atsukawa, M., Aikata, H., Hyogo, H., Chayama, K., Ohashi, T., Ito, K., Yoneda, M., Nozaki, Y., Kawaguchi, T., Torimura, T., Abe, M., Hiasa, Y., Fukai, M., Kamiyama, T., Taketomi, A., Mizokami, M., Kanto, T., 2016. Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 6, 28814. <https://doi.org/10.1038/srep28814>
- Stamateris, R.E., Sharma, R.B., Hollern, D.A., Alonso, L.C., 2013. Adaptive β -cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E149-159. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00040.2013>
- Stanley, E.R., Chitu, V., 2014. CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a021857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021857>
- Steil, G.M., Trivedi, N., Jonas, J.C., Hasenkamp, W.M., Sharma, A., Bonner-Weir, S., Weir, G.C., 2001. Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E788-796. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E788>
- Stützer, I., Esterházy, D., Stoffel, M., 2012. The pancreatic beta cell surface proteome. *Diabetologia* 55, 1877–1889. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2531-3>
- Swiecki, M., Colonna, M., 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 471–485. <https://doi.org/10.1038/nri3865>
- Taban, Q., Mumtaz, P.T., Masoodi, K.Z., Haq, E., Ahmad, S.M., 2022. Scavenger receptors in host defense: from functional aspects to mode of action. *Cell Commun. Signal. CCS* 20, 2. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00812-0>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Taylor, E.B., 2021. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 135, 731–752. <https://doi.org/10.1042/CS20200895>

- Teng, Y.H.-F., Aquino, R.S., Park, P.W., 2012. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 31, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.10.001>
- Thomas, D., Apovian, C., 2017. Macrophage functions in lean and obese adipose tissue. *Metabolism.* 72, 120–143. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.04.005>
- Tian, Y., Shen, H., Xia, L., Lu, J., 2013. Elevated Serum and Synovial Fluid Levels of Interleukin-34 in Rheumatoid Arthritis: Possible Association with Disease Progression via Interleukin-17 Production. *J. Interferon Cytokine Res.* 33, 398–401. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0122>
- Tokarz, V.L., MacDonald, P.E., Klip, A., 2018. The cell biology of systemic insulin function. *J. Cell Biol.* 217, 2273–2289. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
- Tsonkova, V.G., Sand, F.W., Wolf, X.A., Grunnet, L.G., Kirstine Ringgaard, A., Ingvorsen, C., Winkel, L., Kalisz, M., Dalgaard, K., Bruun, C., Fels, J.J., Helgstrand, C., Hastrup, S., Öberg, F.K., Vernet, E., Sandrini, M.P.B., Shaw, A.C., Jessen, C., Grønborg, M., Hald, J., Willenbrock, H., Madsen, D., Wernersson, R., Hansson, L., Jensen, J.N., Plesner, A., Alanentalo, T., Petersen, M.B.K., Grapin-Botton, A., Honoré, C., Ahnfelt-Rønne, J., Hecksher-Sørensen, J., Ravassard, P., Madsen, O.D., Rescan, C., Frogne, T., 2017. The EndoC- β H1 cell line is a valid model of human beta cells and applicable for screenings to identify novel drug target candidates. *Mol. Metab.* 8, 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.12.007>
- Tudurí, E., Soriano, S., Almagro, L., García-Heredia, A., Rafacho, A., Alonso-Magdalena, P., Nadal, Á., Quesada, I., 2022a. The Effects of Aging on Male Mouse Pancreatic β -Cell Function Involve Multiple Events in the Regulation of Secretion: Influence of Insulin Sensitivity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 77, 405–415. <https://doi.org/10.1093/gerona/glab276>
- Tudurí, E., Soriano, S., Almagro, L., Montanya, E., Alonso-Magdalena, P., Nadal, Á., Quesada, I., 2022b. The pancreatic β -cell in ageing: Implications in age-related diabetes. *Ageing Res. Rev.* 80, 101674. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101674>
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L., 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* 46, 845–852.
- Varela, M.L., Mogildea, M., Moreno, I., Lopes, A., 2018. Acute Inflammation and Metabolism. *Inflammation* 41, 1115–1127. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0739-1>
- Varghese, M., Song, J., Singer, K., 2021. Age and Sex: Impact on adipose tissue metabolism and inflammation. *Mech. Ageing Dev.* 199, 111563. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111563>
- Varol, C., Mildner, A., Jung, S., 2015. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 643–675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
- Vasiljević, J., Torkko, J.M., Knoch, K.-P., Solimena, M., 2020. The making of insulin in health and disease. *Diabetologia* 63, 1981–1989. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05192-7>

- Vilahur, G., Badimon, L., 2015. Biological actions of pentraxins. *Vascul. Pharmacol.* 73, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.001>
- Wada, Y., Gonzalez-Sanchez, H.M., Weinmann-Menke, J., Iwata, Y., Ajay, A.K., Meineck, M., Kelley, V.R., 2019. IL-34-Dependent Intrarenal and Systemic Mechanisms Promote Lupus Nephritis in MRL-Faslpr Mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 30, 244–259. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018090901>
- Wang, B., Ma, Z., Wang, M., Sun, X., Tang, Y., Li, M., Zhang, Y., Li, F., Li, X., 2017. IL-34 Upregulated Th17 Production through Increased IL-6 Expression by Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes. *Mediators Inflamm.* 2017, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/1567120>
- Wang, B., Tang, Y., Sun, X., Ouyang, X., Li, H., Wei, J., Zhang, Y., Li, X., 2018. Increased IL-6 expression on THP-1 by IL-34 stimulation up-regulated rheumatoid arthritis Th17 cells. *Clin. Rheumatol.* 37, 127–137. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3746-y>
- Wang, H., Cao, J., Lai, X., 2016. Serum Interleukin-34 Levels Are Elevated in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Mol. Basel Switz.* 22, E35. <https://doi.org/10.3390/molecules22010035>
- Wang, J., Li, D., Pan, Y., Li, J., Jiang, Q., Liu, D., Hou, Y., 2021. Interleukin-34 accelerates intrauterine adhesions progress related to CX3CR1+ monocytes/macrophages. *Eur. J. Immunol.* 51, 2501–2512. <https://doi.org/10.1002/eji.202149174>
- Wang, Y., Bugatti, M., Ulland, T.K., Vermi, W., Gilfillan, S., Colonna, M., 2016. Nonredundant roles of keratinocyte-derived IL-34 and neutrophil-derived CSF1 in Langerhans cell renewal in the steady state and during inflammation. *Eur. J. Immunol.* 46, 552–559. <https://doi.org/10.1002/eji.201545917>
- Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–760. <https://doi.org/10.1038/ni.2360>
- Wechsler, M.E., Munitz, A., Ackerman, S.J., Drake, M.G., Jackson, D.J., Wardlaw, A.J., Dougan, S.K., Berdnikovs, S., Schleich, F., Matucci, A., Chanez, P., Prazma, C.M., Howarth, P., Weller, P.F., Merkel, P.A., 2021. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clin. Proc.* 96, 2694–2707. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.04.025>
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808. <https://doi.org/10.1172/JCI19246>
- Weitz, J.R., Jacques-Silva, C., Qadir, M.M.F., Umland, O., Pereira, E., Qureshi, F., Tamayo, A., Dominguez-Bendala, J., Rodriguez-Diaz, R., Almaça, J., Caicedo, A., 2020. Secretory Functions of Macrophages in the Human Pancreatic Islet Are Regulated by Endogenous Purinergic Signaling. *Diabetes* 69, 1206–1218. <https://doi.org/10.2337/db19-0687>

- Weitz, J.R., Makhmutova, M., Almaça, J., Stertmann, J., Aamodt, K., Brissova, M., Speier, S., Rodriguez-Diaz, R., Caicedo, A., 2018. Mouse pancreatic islet macrophages use locally released ATP to monitor beta cell activity. *Diabetologia* 61, 182–192. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4416-y>
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T.-H., Brickey, W.J., Ting, J.P.-Y., 2011. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 12, 408–415. <https://doi.org/10.1038/ni.2022>
- Westwell-Roper, C.Y., Ehses, J.A., Verchere, C.B., 2014. Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 β production and β -cell dysfunction. *Diabetes* 63, 1698–1711. <https://doi.org/10.2337/db13-0863>
- Xie, H.H., Shen, H., Zhang, L., Cui, M.Y., Xia, L.P., Lu, J., 2018. Elevated Serum Interleukin-34 Level in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Disease Activity. *Sci. Rep.* 8, 3462. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21859-z>
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., Chen, H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830. <https://doi.org/10.1172/JCI19451>
- Xu, R., Sun, H.-F., Williams, D.W., Jones, A.V., Al-Hussaini, A., Song, B., Wei, X.-Q., 2015. IL-34 Suppresses *Candida albicans* Induced TNF α Production in M1 Macrophages by Downregulating Expression of Dectin-1 and TLR2. *J. Immunol. Res.* 2015, 328146. <https://doi.org/10.1155/2015/328146>
- Yang, S., Zhao, M., Jia, S., 2023. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 14, 1080310. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1080310>
- Ye, Y., Gaugler, B., Mohty, M., Malard, F., 2020. Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases. *Clin. Transl. Immunol.* 9, e1139. <https://doi.org/10.1002/cti2.1139>
- Ying, W., Fu, W., Lee, Y.S., Olefsky, J.M., 2020. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities. *Nat. Rev. Endocrinol.* 16, 81–90. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0286-3>
- Ying, W., Lee, Y.S., Dong, Y., Seidman, J.S., Yang, M., Isaac, R., Seo, J.B., Yang, B.-H., Wollam, J., Riopel, M., McNelis, J., Glass, C.K., Olefsky, J.M., Fu, W., 2019. Expansion of Islet-Resident Macrophages Leads to Inflammation Affecting β Cell Proliferation and Function in Obesity. *Cell Metab.* 29, 457-474.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.003>
- Yu, G., Bing, Y., Zhu, S., Li, W., Xia, L., Li, Y., Liu, Z., 2015. Activation of the interleukin-34 inflammatory pathway in response to influenza A virus infection. *Am. J. Med. Sci.* 349, 145–150. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000373>

- YU, Y., YANG, D., QIU, L., OKAMURA, H., GUO, J., HANEJI, T., 2014. Tumor necrosis factor- α induces interleukin-34 expression through nuclear factor- κ B activation in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Mol. Med. Rep.* 10, 1371–1376. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2353>
- Zdravkovic, N., Rosic, M., Lutovac, M., Zdravkovic, V., 2017. Physiology and Pathology of Cytokine: Commercial Production and Medical Use, in: Rezaei, N. (Ed.), *Physiology and Pathology of Immunology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72200>
- Zheng, Y., Ley, S.H., Hu, F.B., 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
- Zhou, J., Sun, X., Zhang, J., Yang, Y., Chen, D., Cao, J., 2018. IL-34 regulates IL-6 and IL-8 production in human lung fibroblasts via MAPK, PI3K-Akt, JAK and NF- κ B signaling pathways. *Int. Immunopharmacol.* 61, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.05.023>
- Zhou, R., Wu, X., Xie, Y., Dai, B., Hu, W., Ge, J., Chen, F., 2016. Functions of interleukin-34 and its emerging association with rheumatoid arthritis. *Immunology* 149, 362–373. <https://doi.org/10.1111/imm.12660>
- Zhou, S.-L., Hu, Z.-Q., Zhou, Z.-J., Dai, Z., Wang, Z., Cao, Y., Fan, J., Huang, X.-W., Zhou, J., 2016. miR-28-5p-IL-34-macrophage feedback loop modulates hepatocellular carcinoma metastasis. *Hepatol. Baltim. Md* 63, 1560–1575. <https://doi.org/10.1002/hep.28445>
- Zinselmeyer, B.H., Vomund, A.N., Saunders, B.T., Johnson, M.W., Carrero, J.A., Unanue, E.R., 2018. The resident macrophages in murine pancreatic islets are constantly probing their local environment, capturing beta cell granules and blood particles. *Diabetologia* 61, 1374–1383. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4592-4>
- Zorena, K., Jachimowicz-Duda, O., Wąż, P., 2016. The cut-off value for interleukin 34 as an additional potential inflammatory biomarker for the prediction of the risk of diabetic complications. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 21, 276–282. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2016.1138321>
- Zwick, R.K., Guerrero-Juarez, C.F., Horsley, V., Plikus, M.V., 2018. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab.* 27, 68–83. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.002>
- Zwicker, S., Bureik, D., Bosma, M., Martinez, G.L., Almer, S., Boström, E.A., 2016. Receptor-Type Protein-Tyrosine Phosphatase ζ and Colony Stimulating Factor-1 Receptor in the Intestine: Cellular Expression and Cytokine- and Chemokine Responses by Interleukin-34 and Colony Stimulating Factor-1. *PloS One* 11, e0167324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167324>

Production scientifique

1. Articles

Jean-François Augusto, Céline Beauvillain, Caroline Poli, Léa Paolini, Isabelle Tournier, Pascale Pignon, Simon Blanchard, Laurence Preisser, Raffaella Soleti, **Chloé Delépine**, Marine Monnier, Isabelle Douchet, Pierre Asfar, François Beloncle, Olivier Guisset, Renaud Prével, Alain Mercat, Emeline Vinatier, Julien Goret, Jean-François Subra, Dominique Couez, Mark R Wilson, Patrick Blanco, Pascale Jeannin, Yves Delneste. **“Clusterin neutralizes the inflammatory and cytotoxic properties of extracellular histones”**, 2023, Am J Respir Crit Care Med IF=30,5.

Chloé Delépine, Emilie Courty, Laurence Preisser, Raffaella Soleti, Laetitia Basset, Laure Rolland, Marine Monnier, Gianni Pasquetti, Pascale Pignon, Nathalie Mérillon, Aline Schmidt, Julie Kerr-Conte, Dominique Couez, Pascale Jeannin, Jean-Sébastien Annicotte, Yves Delneste, Céline Beauvillain. **“IL-34 is expressed in the pancreas and regulates local inflammation.”**

2. Communications

a. Orales

Juin 2023 : communication orale sélectionnée à la journée scientifique de la SFR ICAT. “Deciphering the role of IL-34 in type 2 diabetes: towards a novel therapeutic strategy.” || Angers

Juin 2020 : communication orale sélectionnée à la journée scientifique de la SFR. “The role of Interleukin 34 in diabetes” || Angers

b. Affichées

Avril 2023 : “Deciphering the role of IL-34 in type 2 diabetes: towards a novel therapeutic strategy.” || Journée de l'école Doctorale Biologie Santé, Nantes.

Décembre 2022 : “Deciphering the role of IL-34 in type 2 diabetes: towards a novel therapeutic strategy.” || Recherche Biomédicale Angers-Tours, Angers.

Novembre 2022 : “Deciphering the role of IL-34 in type 2 diabetes: towards a novel therapeutic strategy.” || Congrès de la société française d'Immunologie, Nice.

Décembre 2021 : “Role of Interleukin 34 in pancreatic physiology.” || Journée de Recherche Biomédicale Angers-Tours, Angers.

Juin 2021 : “Role of Interleukin 34 in pancreatic physiology.” || Journée scientifique de la SFR || Angers.

Octobre 2020 et 2021 : animation à la fête de la Science || Angers.

3. Encadrement et enseignement

Janvier – Février 2022 : encadrement stagiaire Master 1 biologie pendant deux mois. || « Rôle de l’interleukine 34 sur la physiologie du pancréas ».

Octobre 2022 encadrement de travaux pratiques en Immunologie : cycle préparatoire 2^e année génie biologique et santé. Polytech Angers, Ecole d’Ingénieur de l’Université d’Angers.

Janvier- Février 2021 : encadrement de deux stagiaires de Médecine suivant le Master 1 biologie. || « Rôle de l’interleukine 34 sur la physiologie du pancréas ».

Table des matières

Figure 1 : Mécanismes de l'immunité innée et adaptative. L'immunité innée est la première ligne de défense en cas d'infection. Si les barrières épithéliales sont franchies, les cellules et les molécules de l'immunité innée résidentes dans les tissus (mastocytes, cellules phagocytaires, cellules dendritiques, facteurs solubles, lymphocytes innés) participent à l'élimination des microbes. La réponse immunitaire adaptative est initiée plus tardivement et repose sur les lymphocytes T et B et des facteurs solubles qu'ils produisent. (<i>D'après Abul K Abbas et al, Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, 2020</i>).....	1
Figure 2 : Classification des différents récepteurs de l'immunité innée (PPRs). Les récepteurs de l'immunité innée impliqués dans la reconnaissance des PAMPs et des DAMPs peuvent être sécrétés ou associés aux cellules. Les récepteurs associés aux cellules de la famille des récepteurs d'épuration (SR) et lectines de type C sont impliqués dans des mécanismes d'endocytose tandis que les PRRs de type TLR (<i>Toll-Like receptor</i>), NLR (<i>NOD-Like receptor</i>) et RLR (<i>RIG-Like receptor</i>) sont des récepteurs de signalisation. Les PRRs sécrétés favorisent l'opsonisation et comprennent certaines lectines de type C, les pentraxines et le complément. <i>Adapté du cours d'Immunologie du professeur Pascale Jeannin. ...</i>	2
Figure 3 : Production des cellules sanguines pendant l'hématopoïèse. La cellule souche hématopoïétique (CSH) se différencie en cellule progénitrice myéloïde ou lymphoïde. La cellule progénitrice myéloïde se différencie pour donner naissance aux plaquettes, aux érythrocytes et autres leucocytes. D'autre part, la différenciation de la cellule progénitrice lymphoïde aboutit aux différents lymphocytes. Abréviations : Cellule souche hématopoïétique à long-terme (LT-CSH), Cellule souche hématopoïétique à court-terme (ST-CSH), Progéniteur Multipotent (MPP), Progéniteur Myéloïde Commun (CMP), Progéniteur Erythro-Mégakaryocytaire (EMP), Progéniteur Granulo-Monocytaire (GMP), Progéniteur Lymphoïde Commun (CLP). <i>Adapté de (Larsson et al 2005, Notta et al. 2016, Tusi 2018, Blank et Karlsson 2015).</i>	6
Figure 4 : Exemple d'une réaction inflammatoire suite à une lésion cutanée. Le passage de la barrière épithéliale induit l'infection par le microbe. La reconnaissance des motifs exprimés à sa surface entraîne l'activation des cellules de l'immunité notamment des mastocytes et des macrophages. Les macrophages participent au recrutement des neutrophiles par libération de cytokines pro-inflammatoires (chimiotactisme) et les mastocytes libèrent des médiateurs qui favorisent la vasodilatation. Une fois recrutés, les neutrophiles se fixent à l'endothélium et migrent dans le tissu où ils participent à l'élimination du microbe par phagocytose. Une fois la menace éliminée, les macrophages libèrent des facteurs diminuant l'inflammation et participant à la réparation tissulaire.	11

Figure 5 : Origine et développement des macrophages. Les macrophages tissulaires se développent dès le stade embryonnaire au niveau du sac vitellin ainsi que dans le foie fœtal et finalement dans la moelle osseuse chez l'adulte. Les cellules souches hématopoïétiques se différencient en cellules progénitrices myéloïdes qui elles-mêmes se différencient successivement en monocytes. Une fois recrutés, les monocytes activés se différencient en macrophages dans les tissus..... 14

Figure 6 : Génération et polarisation des macrophages humains et murins. (A) Les macrophages humains (panel de gauche) sont générés en présence de différentes cytokines. Les macrophages de type M1 se différencient sous l'influence du GM-CSF à l'inverse des macrophages de type M2 qui se polarisent sous l'action de l'IL-34 ou du M-CSF. Les macrophages murins (panel de droite) sont générés en présence de M-CSF à partir des cellules progénitrices de la moelle osseuse (BMDM). L'utilisation du GM-CSF favorise la formation de cellules dendritiques et de macrophages. **(B)** Représentation des marqueurs exprimés par les macrophages de type M1 et M2 humains (gauche) et murins (droite) ainsi que des cytokines produites par ces derniers. *Adapté de (Monnier et al., 2022).* 15

Figure 7 : Structure de l'Interleukine 34. (A) Structure primaire de l'IL-34. **(B)** Représentation en ruban de l'IL-34 dimérique. *Adapté de (Nakamichi et al., 2013).*..... 21

Figure 8 : Les voies de signalisations induites par l'IL-34. L'IL-34 sécrétée se lie au domaine extracellulaire de PTP ζ et CD115 ainsi qu'aux chaînes de chondroïtine sulfate de syndecan 1 entraînant l'activation de différentes voies de signalisations qui régulent des fonctions cellulaires majeures telles que la prolifération, la survie, le métabolisme, l'expression de cytokines/chimiokines de même que l'adhésion cellulaire et la migration. *Adapté de (Baghadadi et al, JLB, 2018 ; Zhou et al, Immunology, 2016 ; Munoz-Garcia et al, Theranostics, 2021).*..... 23

Figure 9 : Rôle direct et indirect de l'IL-34 au niveau cellulaire. L'IL-34 se lie à son récepteur CD115 pour induire la différenciation des monocytes en macrophages immunorégulateurs. Dans le microenvironnement tumoral (MET), ce rôle participe à l'accumulation des macrophages associés aux tumeurs (TAMs). Les macrophages de type M2 et les TAMs différenciés sous IL-34 participent à la différenciation des lymphocytes T de type Th17. Les macrophages M2 peuvent également induire la polarisation des lymphocytes T de type Treg qui eux-mêmes produisent de l'IL-34. Parallèlement, l'IL-34 peut favoriser la différenciation des ostéoclastes..... 27

Figure 10 : Résumé des actions de l'IL-34 en conditions pathologiques. L'IL-34 est une cytokine induite dans différentes maladies inflammatoires telles que les maladies neurologiques, les lésions cardiaques, la fibrose hépatique, les lésions rénales, les maladies inflammatoires de l'intestin, le lupus érythémateux systémique, la maladie de Sjögren, le diabète, l'obésité, l'endométriose et l'arthrite rhumatoïde. Réponse inflammatoire (RI), barrière hémato-encéphalique (BHE), cellules épithéliales tubulaires (TEC), macrophages (M ϕ), résistance à l'insuline (IR), les cellules mononucléaires de la

lamina propria (LPMC), stéatose hépatique non alcoolique (NASH). <i>Adapté de (Baghdadi et al., 2017).</i>	35
Figure 11 : Anatomie du pancréas humain et murin. (A) Le pancréas humain et les organes voisins. (C) Le pancréas murin et les organes voisins. Vue microscopique des îlots de Langerhans humains (B) et murins (D)	37
Figure 12 : Régulation de la glycémie par les îlots pancréatiques. Les cellules β des îlots de Langerhans sécrètent l'insuline en réponse à une augmentation du taux de glucose dans le sang (hyperglycémie). L'insuline libérée dans le sang favorise l'absorption du glucose par les tissus cibles : foie, tissu adipeux et muscles. A l'inverse, quand le taux de glucose sanguin est trop faible (hypoglycémie), les cellules α des îlots de Langerhans sécrètent le glucagon. Le glucagon stimule des voies de signalisation dans les tissus comme le foie favorisant la glycogénolyse et la néoglucogenèse. <i>Adapté de (Pasquier, 2016).</i>	38
Figure 13 : Stimulation des cellules β pancréatiques et sécrétion d'insuline. Le glucose exogène est transporté dans la cellule β pancréatique par le transporteur GLUT2 où il est soumis à la glycolyse. L'élévation du niveau d'ATP par l'activation du cycle de Krebs dans les mitochondries altère le ratio ATP/ADP qui entraîne la fermeture des canaux potassiques (K^+) sensibles à l'ATP. En conséquence, la membrane lipidique se dépolarise et les canaux calciques voltages dépendants s'ouvrent. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire induit la fusion des granules d'insuline avec la membrane et la libération de l'hormone dans le milieu extracellulaire. <i>Adapté de (Röder et al., 2016).</i>	40
Figure 14 : Synthèse et sécrétion de l'insuline. L'ARNm de l'insuline est transcrit dans le noyau des cellules β pancréatiques puis traduit sous forme de préproinsuline dans le réticulum endoplasmique rugueux. Une fois transporté dans l'appareil de Golgi, le peptide signal est clivé pour donner forme à la proinsuline. La forme mature de l'insuline sera conservée dans des granules cytoplasmiques avant sa libération dans l'organisme. <i>Adapté de (Tokarz et al., 2018; Vasiljević et al., 2020).</i>	42
Figure 15 : Activation de la signalisation induite par l'insuline. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation de résidus tyrosines kinase spécifiques. Une fois activé, le récepteur à l'insuline recrute des protéines adaptatrices pour initier une cascade de phosphorylation entraînant l'activation et la répression d'un réseau protéique qui médient les effets de l'insuline sur la production du glucose, son utilisation et son absorption de même que la synthèse de glycogène, de protéines et de lipides. <i>Adapté de (De Meyts, 2000; Haeusler et al., 2018).</i>	44
Figure 16 : Conséquences métaboliques et inflammatoires de l'expansion du tissu adipeux en condition d'obésité. Le déséquilibre de la balance énergétique favorise l'expansion progressive du tissu adipeux par des phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie sur les adipocytes. Cette expansion du tissu adipeux entraîne le recrutement de monocytes qui se différencient en macrophages pro- inflammatoires chez les personnes en situation d'obésité. Le déséquilibre de sécrétion des adipokines, l'hypoxie, et la lipotoxicité sont les conséquences de l'incapacité des adipocytes à stocker les graisses.	

L'infiltrat immunitaire associé promeut l'inflammation locale par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. 49

Figure 17 : Impact de l'obésité sur les tissus sensibles à l'insuline et sur la morphologie des îlots pancréatiques. En situation d'obésité, l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline favorisent le stockage des acides gras libres dans les organes associés à l'homéostasie du glucose entraînant des désordres métaboliques dans ces derniers. Au niveau des îlots de Langerhans du pancréas, la masse des cellules β augmente pour compenser la résistance à l'insuline des tissus. Cette surproduction entraîne in fine une dysfonction sécrétoire des îlots et la perte des cellules β au stade DT2. 52

Figure 18 : Îlots de Langerhans et inflammation au cours du développement du diabète de type 2. En condition normale, les îlots de Langerhans présentent une immunité locale et une sécrétion d'insuline dans les conditions homéostatiques. Les déséquilibres métaboliques (lipotoxicité, glycotoxicité et résistance à l'insuline) induits par l'obésité entraînent une augmentation de la masse des cellules β , des macrophages intra-îlots et des cytokines pro-inflammatoires. Le maintien de ce milieu inflammatoire conduit finalement la détérioration de la masse des cellules β et de leur fonction entraînant le développement du diabète de type 2. 55

Figure 19 : Schéma bilan de l'étude du rôle de l'IL-34 dans la physiologie du pancréas. En condition d'inflammation induite par le vieillissement ou l'obésité, l'IL-34 module les effets des cytokines pro-inflammatoires sur la sécrétion d'insuline. L'inhibition de l'expression d'IL-34 favorise l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires qui impacte la sécrétion d'insuline. La signalisation des cytokines joue un rôle majeur dans le microenvironnement des îlots de Langerhans et un déséquilibre affecte le métabolisme du glucose. 69

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des oligonucléotides utilisés pour le génotypage des souris. 60

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour le marquage des différentes populations immunitaires. 63

Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour l'analyse de l'expression génique. 65

Annexe

Annexe

Jean-François Augusto, Céline Beauvillain, Caroline Poli, Léa Paolini, Isabelle Tournier, Pascale Pignon, Simon Blanchard, Laurence Preisser, Raffaella Soleti, **Chloé Delépine**, Marine Monnier, Isabelle Douchet, Pierre Asfar, François Beloncle, Olivier Guisset, Renaud Prével, Alain Mercat, Emeline Vinatier, Julien Goret, Jean-François Subra, Dominique Couez, Mark R Wilson, Patrick Blanco, Pascale Jeannin, Yves Delneste. **“Clusterin neutralizes the inflammatory and cytotoxic properties of extracellular histones”**, 2023, Am J Respir Crit Care Med IF=30,5.

RÉSUMÉ

L'interleukine 34 (IL-34) est une cytokine décrite comme un second ligand pour le récepteur au M-CSF, CD115. Elle a été identifiée comme majoritairement produite au niveau de la peau et du cerveau où elle participe à la maintenance des cellules de Langerhans et de la microglie, respectivement. L'IL-34 est identifiée comme surexprimée dans de nombreuses pathologies inflammatoires.

Dans notre étude, nous avons observé une expression constitutive d'IL-34 dans les îlots de Langerhans humains et murins. L'analyse des effets de l'inactivation du gène de l'IL-34 dans les cellules β dans un modèle de souris mis en place au laboratoire (IL-34 ^{Δ Pdx}) a mis en évidence un rôle de la cytokine dans l'immunité locale pancréatique.

En vieillissant, les souris IL-34 ^{Δ Pdx} présentent une altération de la tolérance au glucose associée à une inflammation locale plus prononcée que les souris contrôles. Ce phénotype est exacerbé quand les souris sont soumises à un régime riche en graisse et en sucre. La sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans des souris contrôles est altérée en présence de cytokines pro-inflammatoires. L'ajout d'IL-34 restaure la sécrétion d'insuline. En outre, la production d'IL-34 est augmentée chez les patients diabétiques de type 2.

Ces résultats suggèrent que l'IL-34 synthétisée localement dans les îlots pancréatiques aurait un rôle protecteur dans un contexte inflammatoire chronique.

Mots-clés : interleukine 34, inflammation, métabolisme, pancréas, insuline.

ABSTRACT

Interleukin 34 (IL-34) is a cytokine described as a second ligand for the M-CSF receptor, CD115. IL-34 has been identified as predominantly produced in the skin and brain, where it is involved in the maintenance of Langerhans cells and microglia. IL-34 has been identified as overexpressed in several inflammatory pathologies.

In our study, we observed a constitutive expression of IL-34 in human and murine Langerhans islets. Analysis of *IL34* gene inactivation effects in β cells in a mouse model (IL-34 ^{Δ Pdx}) highlighted a role for the cytokine in local immunity.

As they aged, IL-34 ^{Δ Pdx} mice showed impaired glucose tolerance associated with more pronounced local inflammation than control mice. This phenotype is exacerbated when mice are subjected to a high-fat diet. Insulin secretion from the islets of control mice is impaired in the presence of pro-inflammatory cytokines. The addition of IL-34 restores insulin release. Moreover, IL-34 production is increased in type 2 diabetic patients.

These results support the idea of a protective role for IL-34 locally in pancreatic islets in a chronic inflammatory context.

Keywords: interleukin-34, inflammation, metaflammation, pancreas, insulin.

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



Clusterin Neutralizes the Inflammatory and Cytotoxic Properties of Extracellular Histones in Sepsis

Jean-François Augusto^{1,2,*}, Céline Beauvillain^{1,3,*}, Caroline Poli^{1,3}, Léa Paolini¹, Isabelle Tournier^{1,5}, Pascale Pignon¹, Simon Blanchard^{1,3}, Laurence Preisser¹, Raffaella Soletti¹, Chloé Delépine¹, Marine Monnier¹, Isabelle Douchet⁶, Pierre Asfar^{4,7}, François Beloncle⁴, Olivier Guisset⁸, Renaud Prével⁸, Alain Mercat⁶, Emeline Vinatier^{1,3}, Julien Goret^{6,9}, Jean-François Subra^{1,2}, Dominique Couez¹, Mark R. Wilson^{10,11}, Patrick Blanco^{6,9,‡}, Pascale Jeannin^{1,3,‡}, and Yves Delneste^{1,3,‡}

¹Univ Angers, Nantes Université, INSERM, CNRS, CRCI²ICAT, Angers, France; ²Département de Néphrologie, Dialyse et Transplantation, ³Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, and ⁴Service de Médecine Intensive et Réanimation, CHU d'Angers, Angers, France; ⁵Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers, France; ⁶UMR-CNRS, ImmunConcept, University of Bordeaux, Bordeaux, France; ⁷Université de Angers, Inserm, CNRS, MITOVASC, SFR ICAT, Angers, France; ⁸Service de Médecine Intensive et Réanimation and ⁹Department of Immunology and Immunogenetics, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France; ¹⁰Molecular Horizons and School of Chemistry and Molecular Bioscience, University of Wollongong, Wollongong, New South Wales, Australia; and ¹¹Illawarra Health and Medical Research Institute, Wollongong, New South Wales, Australia

ORCID IDs: 0000-0003-1498-2132 (J.-F.A.); 0000-0002-7953-0455 (S.B.); 0000-0002-0590-459X (F.B.).

Abstract

Rationale: Extracellular histones, released into the surrounding environment during extensive cell death, promote inflammation and cell death, and these deleterious roles have been well documented in sepsis. Clusterin (CLU) is a ubiquitous extracellular protein that chaperones misfolded proteins and promotes their removal.

Objectives: We investigated whether CLU could protect against the deleterious properties of histones.

Methods: We assessed CLU and histone expression in patients with sepsis and evaluated the protective role of CLU against histones in *in vitro* assays and *in vivo* models of experimental sepsis.

Measurements and Main Results: We show that CLU binds to circulating histones and reduces their inflammatory, thrombotic, and cytotoxic properties. We observed that plasma CLU levels decreased in patients with sepsis and that the decrease was greater and more durable in nonsurvivors than in survivors. Accordingly, CLU deficiency was associated with increased mortality in mouse models of sepsis and endotoxemia. Finally, CLU supplementation improved mouse survival in a sepsis model.

Conclusions: This study identifies CLU as a central endogenous histone-neutralizing molecule and suggests that, in pathologies with extensive cell death, CLU supplementation may improve disease tolerance and host survival.

Keywords: molecular chaperone; inflammation; cell death; sepsis

(Received in original form July 4, 2022; accepted in final form May 3, 2023)

*These authors contributed equally to this work.

‡These authors provided joint supervision.

Supported by institutional grants from Inserm, the University of Angers, and the University Hospital of Angers.

Author Contributions: J.-F.A., C.B., I.T., P.A., P.B., P.J., and Y.D. contributed to the design and conception of the experimental and clinical studies. J.-F.A., C.B., C.P., L. Paolini, R.S., C.D., M.M., I.D., E.V., P.P., J.G., S.B., and L. Preisser performed the experiments. J.-F.A., P.A., F.B., O.G., R.P., and A.M. conducted the clinical study and acquired and analyzed the clinical data. J.-F.S., D.C., and M.R.W. contributed to the analysis of experimental and clinical data and to the interpretation of findings. J.-F.A., C.B., P.J., and Y.D. drafted the manuscript. M.R.W. contributed to the editing of the manuscript. Co-first authors contributed equally and are listed alphabetically. All authors read and approved the final manuscript.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Yves Delneste, Ph.D., Institute for Health Biology, University Hospital of Angers, Inserm, UMR 1307, CNRS 6075, 4 rue Larrey, F-49000 Angers, France. E-mail: yves.delneste@inserm.fr.

This article has a related editorial.

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org.

Am J Respir Crit Care Med Vol 208, Iss 2, pp 176–187, Jul 15, 2023

Copyright © 2023 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.202207-1253OC on May 4, 2023

Internet address: www.atsjournals.org

At a Glance Commentary

Scientific Knowledge on the

Subject: Extracellular histones released by damaged tissues are key pathophysiological actors in sepsis.

What This Study Adds to the

Field: Clusterin was identified as an endogenous inhibitor of extracellular histones.

Tissue injury and accidental cell death can induce the passive release of endogenous molecules in the extracellular milieu. Some of these molecules are detrimental for the host by overwhelming sterile inflammation and inducing cell death and tissue damage, exacerbating the impact on tissue homeostasis. Therefore, they have been reported as involved in the pathophysiology of severe diseases associated with extensive tissue destruction (1).

Among the danger molecules identified so far, histones, released by dying cells, have emerged as major mediators of tissue injury in a variety of diseases such as sepsis, trauma, and ischemia (2–6). In addition to promoting the secretion of cytokines (3, 5, 7–10), histones induce platelet aggregation (11, 12) and cell death (3, 5, 13–16). Injected in mice, histones induce an inflammatory syndrome similar to that induced by microbes, associated with extensive tissue injury (3, 13). Although the inflammatory properties of histones appear dependent on innate immunity receptors (7–9, 13), the mechanism involved in cell death remains unclear.

Targeting extracellular histones may have therapeutic potential. Their neutralization with antibodies (3, 17), heparin (18, 19), activated protein C (APC) (11, 20), thrombomodulin (21), and C1 esterase inhibitor (22) blocks their inflammatory and prothrombotic activity and reduces mortality in models of sepsis. A similar protective role is also observed with some soluble pattern recognition molecules, such as CRP and PTX3 (15, 23). However, the expression of these molecules is dramatically increased in patients with sepsis, especially in nonsurvivors (24, 25), suggesting that elevated expression of these histone-neutralizing molecules is not systematically associated with protection.

Clusterin (CLU) is a multifaceted protein acting as an apolipoprotein, a complement regulator, and an extracellular chaperone (26). As a chaperone, CLU stabilizes a broad range of client proteins and keeps them soluble, inhibiting the formation of toxic aggregates (27, 28). The interaction of CLU with client proteins induces their clearance *in vivo* (27). CLU also confers tissue protection by limiting apoptosis and necrosis (29–31), dampening inflammation (32), and reducing autoimmune responses (33, 34). CLU is found at relatively high concentrations in a variety of biological fluids (35). In humans, the concentrations of serum CLU range from 50 to 400 µg/ml, and its expression is hugely increased in cases of inflammation (36–38). We reported that CLU favors efferocytosis (39), suggesting that it may act as a soluble pattern recognition molecule. It is interesting that histones, which accumulate at the surface of late apoptotic cells (40), have been identified as CLU-binding elements (39). The objective of this study was to evaluate the capacity of CLU to interact with extracellular histones.

Methods

For detailed methodology, see the Supplemental Methods section in the online supplement.

Study Approval

Blood from patients with septic shock and patients with sepsis, in accordance with the Third International Consensus Definitions for Sepsis (41), was collected from patients admitted in the ICU of the University Hospitals of Angers and of Bordeaux between January 6, 2016, and April 29, 2018 (from the prospective longitudinal study SEPSISCLU). This study was conducted with the approval of the University Hospital of Angers Ethics Committee (agreement 2013-26) in accordance with the principles of the Helsinki Declaration of 1964 and its later amendments. Inclusion criteria are detailed elsewhere (see the Supplemental Methods in the online supplement). We also analyzed plasma from a retrospective study (16). Blood and plasma from healthy subjects were obtained from the blood collection center (EFS Pays de la Loire, Angers, France; agreement ANG-2017-01). In accordance with French regulations, we only had access to blood from donors who had given their consent for research use; the samples were anonymized, and only limited information

on donors was available (ages 18–70; weight, >50 kg; no active infectious, neoplastic, hemostatic, or vascular disease). *In vivo* protocols were approved by the Région Pays de la Loire Institutional Ethics Committee and authorized by the French Ministry of Research (agreement CEEA2012.193; APAFIS 5806-20160613120228765v3).

Patients

We analyzed the status of CLU, nucleosomes, citrullinated H3, circulating DNA, and CLU-histone complexes in patients. We calculated scores on the Sequential Organ Failure Assessment and Simplified Acute Physiology Scores II (SAPSII) 24 hours after admission to the ICU. Survival or death was recorded during hospitalization at the ICU of the University Hospitals of Angers and Bordeaux.

In Vitro and *In Vivo* Experiments

We analyzed the capacity of CLU to bind to histones and to inhibit histone-induced cytokine production, cell death, and platelet aggregation. The protective role of CLU was evaluated in animal models of experimental sepsis and endotoxemia.

Statistics

The Mann-Whitney test was used for two-group comparisons, and the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test was used for multiple comparisons. The difference between cell features treated with plasma from patients with septic shock was assessed by using a Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. Correlations were determined using Spearman's rank correlation test. Survival curves were computed using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. Statistical tests were performed using GraphPad Prism software (version 9.3.1), and *P* values <0.05 were considered significant. *n* refer to different independent biological experiments or individual donors.

Results

CLU Chaperones Extracellular Histones

We have previously reported that CLU binds to histones (39). Specifically, CLU bound to histones H2A, H2B, H3, H4, and total histones, whereas no interaction with other danger molecules, such as calreticulin, HSP70, genomic DNA, and HMGB1, was

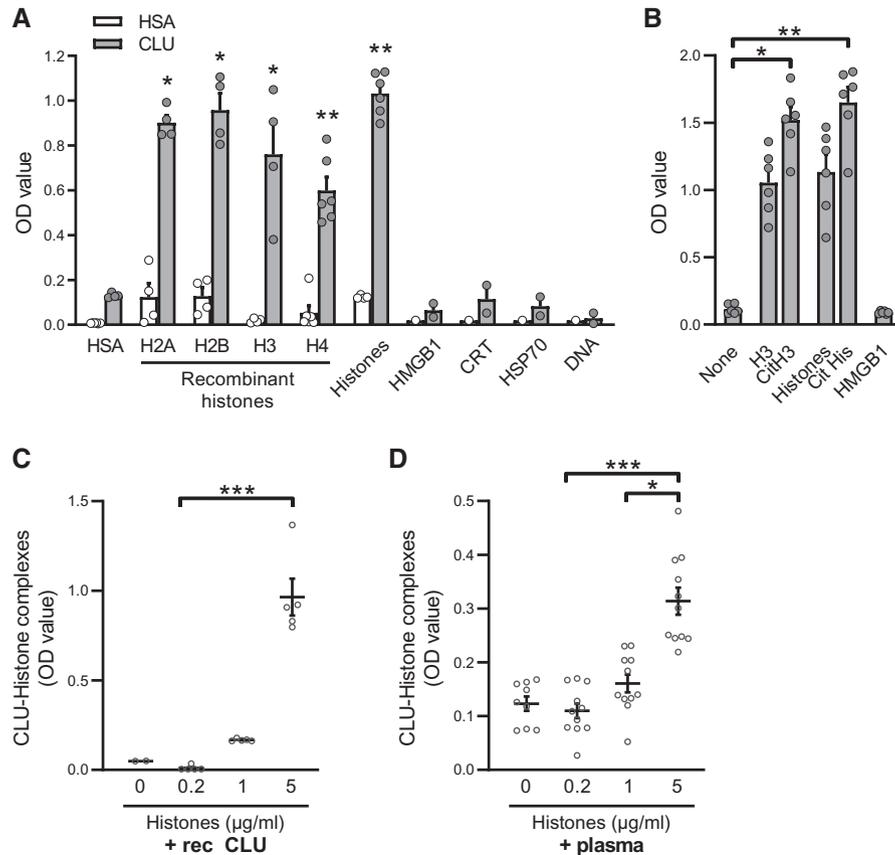


Figure 1. Clusterin (CLU) binds to histones and forms complexes in serum. (A and B) The binding of biotinylated CLU and human serum albumin (HSA) to immobilized H2A, H2B, H3, H4, purified histones, high mobility group box 1 (HMGB1), calreticulin (CRT), HSP70, genomic DNA (A), and to H3, citrullinated H3 (CitH3), purified histones, citrullinated histones (CitHis) and HMGB1 (B), was determined by a solid phase assay (two to six independent experiments). (C and D) 1 µg/ml recombinant CLU (rec CLU) solution (C; $n=2-5$) or plasmas (D; $n=7$) from healthy subjects were supplemented with the indicated doses of purified histones, and clusterin-histone complexes were quantified by ELISA. For (A–D), statistical significance was determined using the Mann-Whitney test between CLU bindings and the corresponding HSA bindings (A) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test (B–D). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. OD = optical density.

detected (Figure 1A). The capacity of CLU to bind to histones was confirmed by surface plasmon resonance analysis, with an estimated K_D value of 4–6 nM (see Figure E1). Studies reported that NETosis, a neutrophil-specific death that may occur during sepsis, was associated with citrullinated histone (CitHis) release (42, 43), a process mediated by peptidyl arginine deiminase 4, or PAD4 (44). Results showed that CLU binds, in a similar manner, to immobilized noncitrullinated and citrullinated histones (Figure 1B) and to extracellular DNA released by phorbol myristol acetate-stimulated neutrophils, treated or not treated with the PAD4 inhibitor Cl-amidine (Figure E1).

Because histones can be released into the circulation in particular conditions, we next assessed whether plasma CLU could chaperone circulating histones. Therefore,

we set up an ELISA to detect CLU-histone complexes. CLU-H4 complexes, generated by mixing a given amount of CLU with increasing doses of H4, were detected in a dose-dependent manner (Figure 1C). CLU-histone complexes were weakly detectable in plasma from healthy subjects, and the addition of increasing doses of H4 to these plasma samples induced a dose-dependent generation of CLU-histone complexes (Figure 1D).

CLU Reduces *In Vivo* Extracellular Histone-induced Inflammation

Extracellular histones induce inflammation (10). In support, histones dose-dependently induced tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and IL-6 production by human monocytes (Figure 2A). We then evaluated whether CLU, by complexing histones, could reduce their inflammatory capacity. Results showed that CLU dose-dependently

inhibited histone-induced TNF- α and IL-6 production by monocytes (Figure 2B). CLU also inhibited CitH3-induced cytokine production by monocytes (see Figure E2). As a control, CLU alone did not induce TNF- α and IL-6, nor did it modulate LPS- and IL-1 β -induced cytokine production (Figures 2B and E2).

We next evaluated the capacity of plasma CLU to dampen histone-induced inflammation. Monocytes were cultured in human plasma either depleted or not depleted in CLU and stimulated with histones. The ability of plasma to neutralize the inflammatory properties of histones was drastically reduced after CLU depletion (Figure 2C). We confirmed this observation using plasma from CLU-deficient mice (Clu $^{-/-}$) in which CLU was undetectable (see Figure E3). The levels of IL-6 and TNF- α produced by histone-stimulated splenocytes

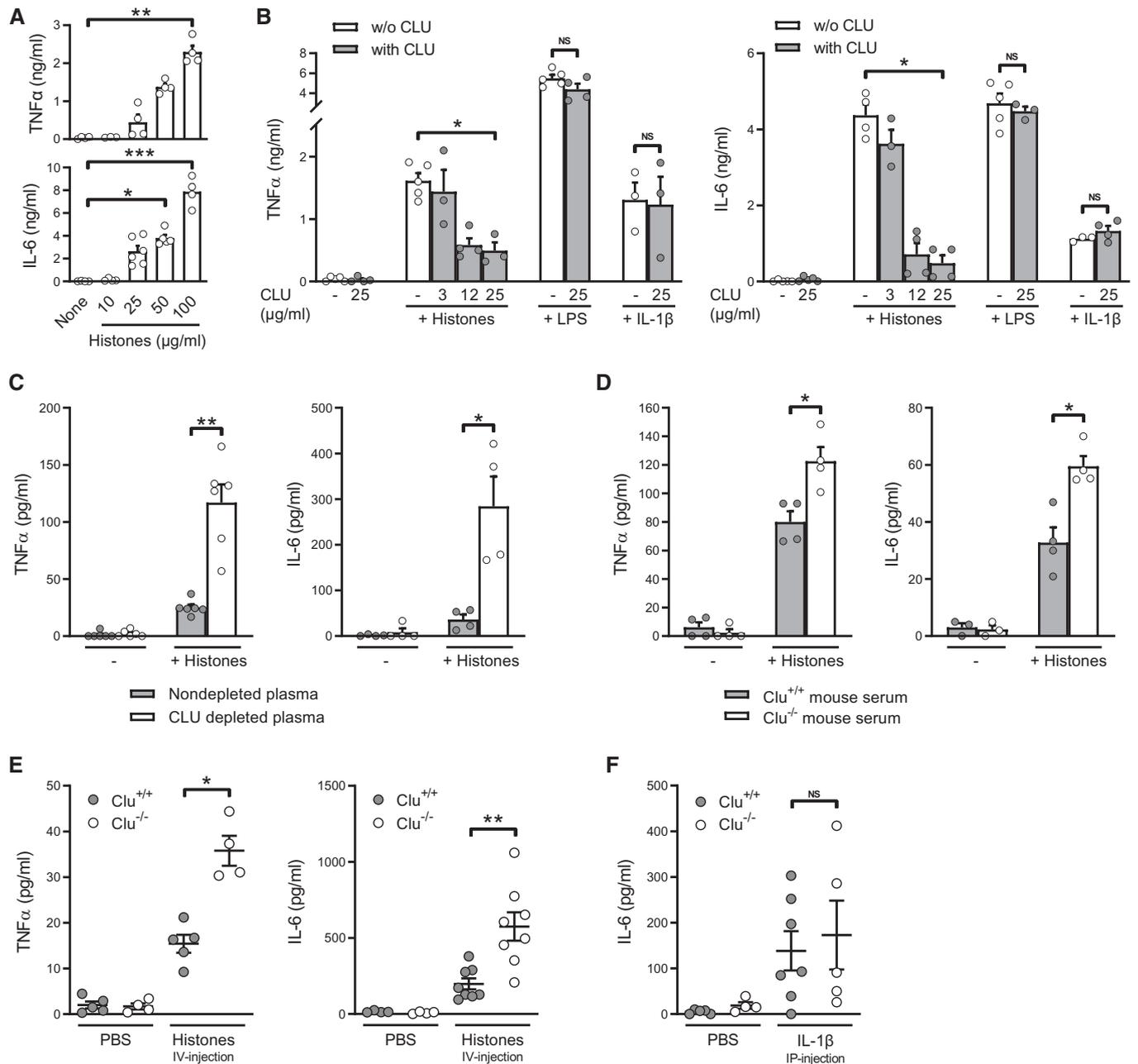


Figure 2. Clusterin (CLU) prevents histone-induced inflammation. (A) Monocytes from healthy subjects were stimulated with 10–100 μg/ml histones for 24 hours ($n = 3–6$). (B) Monocytes from healthy subjects were stimulated or not stimulated with 25 μg/ml histones, 100 ng/ml LPS, or 50 ng/ml IL-1β, with or without the indicated concentrations of CLU ($n = 3–5$). (C) Monocytes from healthy subjects were cultured in medium supplemented with 2% CLU-depleted or untouched plasma from healthy subjects and stimulated or not stimulated with 50 μg/ml histones ($n = 4–6$). (D) Splenocytes from wild-type mice were cultured in medium supplemented with 10% serum from wild-type (Clu^{+/+}) or CLU-deficient (Clu^{-/-}) mice and stimulated with 50 μg/ml histones ($n = 3–4$). For (A)–(D), TNF-α and IL-6 were quantified by ELISA in the 24-hour cell culture supernatants. (E and F) Clu^{+/+} and Clu^{-/-} mice were injected intravenously with PBS or 50 μg histones (E) or intraperitoneally with 10 ng IL-1β (F). IL-6 and TNF-α were quantified in mouse sera after 2 hours ($n = 4–8$). For (A)–(F), statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s *post hoc* test (A and B) or the Mann-Whitney test (B–F). Each dot represents an individual mouse. Data are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. NS = not significant; PBS = phosphate-buffered saline; TNF-α = tumor necrosis factor alpha.

were higher when stimulation occurred in the presence of plasma from Clu^{-/-} mice compared with plasma from wild-type mice (Figure 2D).

To evaluate the *in vivo* relevance of this observation, we compared the inflammatory response induced by an intravenous injection of a nonlethal dose of histones (50 mg/kg) (3)

in wild-type and Clu^{-/-} mice. Histones induced higher levels of IL-6 and TNF-α in Clu^{-/-} than in wild-type mice (Figure 2E). As a control, IL-1β induced similar levels of

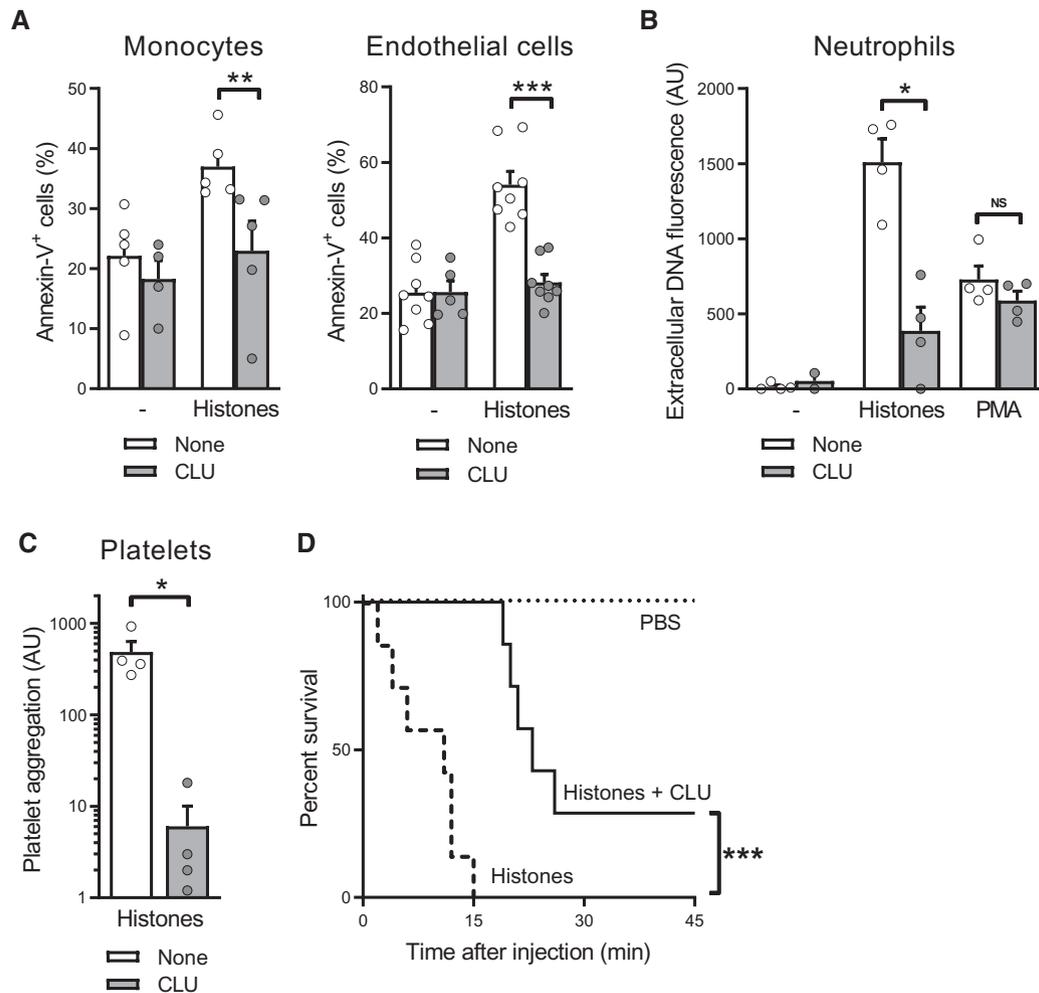


Figure 3. Clusterin (CLU) prevents cellular damage induced by histones. (A) Monocytes ($n=5$) and endothelial cells ($n=8$) were cultured in the absence or presence of $100\ \mu\text{g/ml}$ histones, with or without $50\ \mu\text{g/ml}$ CLU. Cell viability was monitored by flow cytometry after 24 hours. Results are expressed as the percentage of annexin-V⁺ cells. (B) Neutrophils from healthy subjects were cultured in the absence or presence of $50\ \mu\text{g/ml}$ histones or $30\ \text{nM}$ phorbol myristol acetate (PMA), without or with $25\ \mu\text{g/ml}$ CLU. Extracellular DNA was labeled with SYTOX Green, and fluorescence was quantified after 1 hour of incubation. Results are expressed in arbitrary units ($n=4$). (C) Platelets were incubated with $10\ \mu\text{g/ml}$ histones, with or without $25\ \mu\text{g/ml}$ CLU before monitoring aggregation. Results are expressed in AUs ($n=4$). (D) Wild-type mice were injected intravenously with PBS, $50\ \mu\text{g}$ histones, or $50\ \mu\text{g}$ histones mixed with $50\ \mu\text{g}$ CLU ($n=7$ mice per group). Survival curves were computed using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. Results are expressed as percent survival. For (A)–(C), statistical significance was determined using the Mann-Whitney test. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. AU = arbitrary unit; NS = not significant; PBS = phosphate-buffered saline.

IL-6 in both mouse strains (Figure 2F). We verified that splenocytes from both strains were equally sensitive to histone-induced inflammation and that plasma from wild-type mice was similarly protective against histone-induced IL-6 production by splenocytes from wild-type and $\text{Clu}^{-/-}$ mice (Figure E3).

CLU Blunts Extracellular Histone-induced Cell Death

High concentrations of histones are cytotoxic (3, 15, 23). Therefore, we investigated whether CLU may prevent the cytotoxic

activity of histones *in vitro*. As expected (14, 45), histones induced the death of human monocytes, endothelial cells, and neutrophils (Figures 3A and 3B). Preincubation of histones with CLU protected monocytes and endothelial cells from histone-induced death (Figure 3A) and neutrophils from histone-induced NETosis but not from phorbol myristol acetate-induced NETosis (Figure 3B). As expected, CLU also inhibited CitHis-induced cell death (Figure E2). Of note, CLU did not induce cell death by itself (Figures 3A and 3B). Histones also induce platelet aggregation (11, 12), and this

effect was reduced by CLU (Figure 3C). The ability of plasma to neutralize the cytotoxic activity of histones was drastically reduced after CLU depletion, and the addition of CLU reduced histone-induced cell death (see Figure E4).

We then evaluated the ability of CLU to inhibit the *in vivo* cytotoxic activity of histones. An intravenous injection of $100\ \text{mg/kg}$ histones into wild-type mice is lethal, and the percentage of surviving mice was increased when histones were incubated with CLU before injection (Figure 3D). As a control, splenocytes from both strains were

equally sensitive to histone-induced cell death (Figure E3).

CLU-Histone Complexes in Patients with Sepsis Positively Correlate with Disease Severity

We next evaluated the *in vivo* relevance of these observations in sepsis, a prototypic disorder associated with the release of histones by damaged tissues (2–5). We hypothesized that circulating CLU-histone complexes might be present in patients with sepsis, thereby contributing to reducing disease severity. We first analyzed the levels of nucleosomes and CLU-histone complexes in the plasma of 110 patients with sepsis (from the SEPSISCLU study) at ICU admission (Day 0) and on Days 3 and 7. As expected (46), plasma samples from patients with sepsis contained higher levels of nucleosomes than that from healthy subjects (mean \pm SEM: 14.90 \pm 19.30 AU and 0.72 \pm 0.77 AU, respectively; $P < 0.001$) (Figure 4A), and they were higher in nonsurvivors than in survivors (26.15 \pm 26.09 AU vs. 12.55 \pm 16.82 AU; $P = 0.02$) (Figure 4A). Of note, the levels of nucleosomes remained elevated at Days 3 and 7 after admission in both survivors and nonsurvivors (Figure 4B). It is interesting that the levels of CLU-histone complexes were significantly higher in patients with sepsis than in healthy subjects (mean \pm SEM: optical density [OD] values, 0.248 \pm 0.298 and 0.113 \pm 0.094, respectively; $P = 0.02$) and that the levels were equivalent in survivors and nonsurvivors (optical density [OD] values, 0.260 \pm 0.311 and 0.185 \pm 0.220, respectively; $P = 0.15$) (Figure 4C). We also quantified circulating DNA (CircDNA) and circulating CitH3 in sepsis patients at ICU admittance. Results showed that the levels of CitH3 (Figure 4D) and CircDNA (see Figure E5) were increased in patients with sepsis compared with levels in healthy subjects. As expected, the levels of nucleosomes positively correlated with CitH3 and CircDNA (see Figure E6); however, and contrary to findings with nucleosomes, they were not statistically different in nonsurvivors and survivors at ICU admittance (Figures 4D and E5).

Severity of Sepsis Correlates with a Drop in Circulating Levels of CLU

Plasma collected at ICU admission contained lower concentrations of CLU than that from healthy subjects (mean \pm SD:

126.5 \pm 70.3 $\mu\text{g/ml}$ and 269.1 \pm 48.6 $\mu\text{g/ml}$, respectively; $P < 0.001$) (Figure 4E). This decrease in CLU was not due to its complexation to histones, as the interaction of CLU with histones does not affect CLU quantification (see Figure E7). It is interesting that CLU levels were even more decreased in nonsurvivors than in survivors (mean \pm SD: 95.0 \pm 67.5 $\mu\text{g/ml}$ vs. 133.1 \pm 69.5 $\mu\text{g/ml}$; $P < 0.05$) (Figure 4E). These results were confirmed in a retrospective collection of plasma samples collected at ICU admission (see Figure E8). When patients admitted to the ICU were grouped according to the median CLU concentration, subjects with $< 103 \mu\text{g/ml}$ CLU had significantly higher SAPSII scores, lower platelet counts, higher lactic acid concentrations, and lower prothrombin times than patients with CLU $\geq 103 \mu\text{g/ml}$ (see Table E1). Whereas CLU levels recovered to normal levels after 7 days in surviving patients, they remained low in nonsurviving patients (Figure 4F). CircDNA levels, but not CitH3 levels, negatively correlated with CLU concentrations at ICU admittance (Figure E6).

PTX3 and CRP are other histone-binding molecules (15, 23). As reported previously (24, 25), patients at ICU admission had higher levels of PTX3 than healthy subjects (mean \pm SEM: 221.20 \pm 30.56 $\mu\text{g/ml}$) and were higher in nonsurvivors than in survivors (Figure E5). Contrary to CLU levels, PTX3 levels at ICU admittance positively correlated with the levels of nucleosomes and CircDNA (Figure E6) before returning to low levels in both surviving and non-surviving patients during the course of the disease (Figure E5). Similarly, CRP levels were elevated in both groups and gradually returned to low levels (Figure E5).

It is important to note that low levels of CLU at admission were associated with mortality in univariable and multivariable models with adjustment for PTX3 levels, nucleosome levels, or SAPSII scores at admission (see Table E2). Patients classified within the lower tertile of CLU level at admission had a four- to sevenfold increased risk of death, as compared with patients in the highest CLU tertile (Table E2).

The Decrease in CLU Is Not Related to a Defective Synthesis

CLU-client protein complexes are eliminated by hepatocytes, suggesting that the half-life of circulating CLU may be

reduced when complexed to a client protein (29, 32–34). In support, labeled CLU was more efficiently taken up by macrophages when complexed to histones (Figure 5A), suggesting that the drop in circulating CLU in patients may result from the elimination of CLU-histone complexes. Reinforcing this hypothesis, we observed that monocytes isolated from patients expressed high levels of CLU mRNA (Figure 5B) and that monocytes from patients spontaneously produced CLU, contrary to monocytes from healthy subjects that required activation to produce CLU (Figure 5C). Finally, western blot analysis of CLU in plasma from patients and controls did not reveal differences in the apparent molecular mass of CLU, making it unlikely that CLU could be degraded more rapidly during sepsis (see Figure E9).

CLU Supplementation Lowers the Inflammatory and Cytotoxic Properties of Plasma from Patients with Sepsis

Plasma samples from patients with sepsis contain nucleosomes and exhibit inflammatory and cytotoxic properties (16, 47). Contrary to plasma from healthy subjects, plasma from patients induced TNF- α and IL-6 production by monocytes (Figure 6A) and apoptosis (Figure 6B). As plasma from patients contains reduced levels of CLU (Figure 4D), we analyzed the impact of CLU supplementation. Results showed that CLU supplementation of plasma from patients with sepsis and containing high levels of nucleosomes and low levels of CLU reduced cytokine production and cell death (Figures 6A and 6B). Of note, plasma containing low levels of nucleosomes did not impact cytokine production and cell death.

CLU Protects Mice in Experimental Models of Endotoxemia and Sepsis

Our results showed that CLU neutralizes histones and that its levels are sustainably low in the most severe forms of sepsis. We, therefore, evaluated the protective role of endogenous CLU and the benefit of exogenous CLU supplementation in experimental sepsis and endotoxemia. As expected, the levels of CLU were decreased, and the levels of nucleosomes and CLU-histone complexes were increased in mice subjected to acute endotoxemia (Figure 7A). The levels of nucleosomes and CLU-histone complexes were also decreased in mice subjected to cecal ligation and puncture

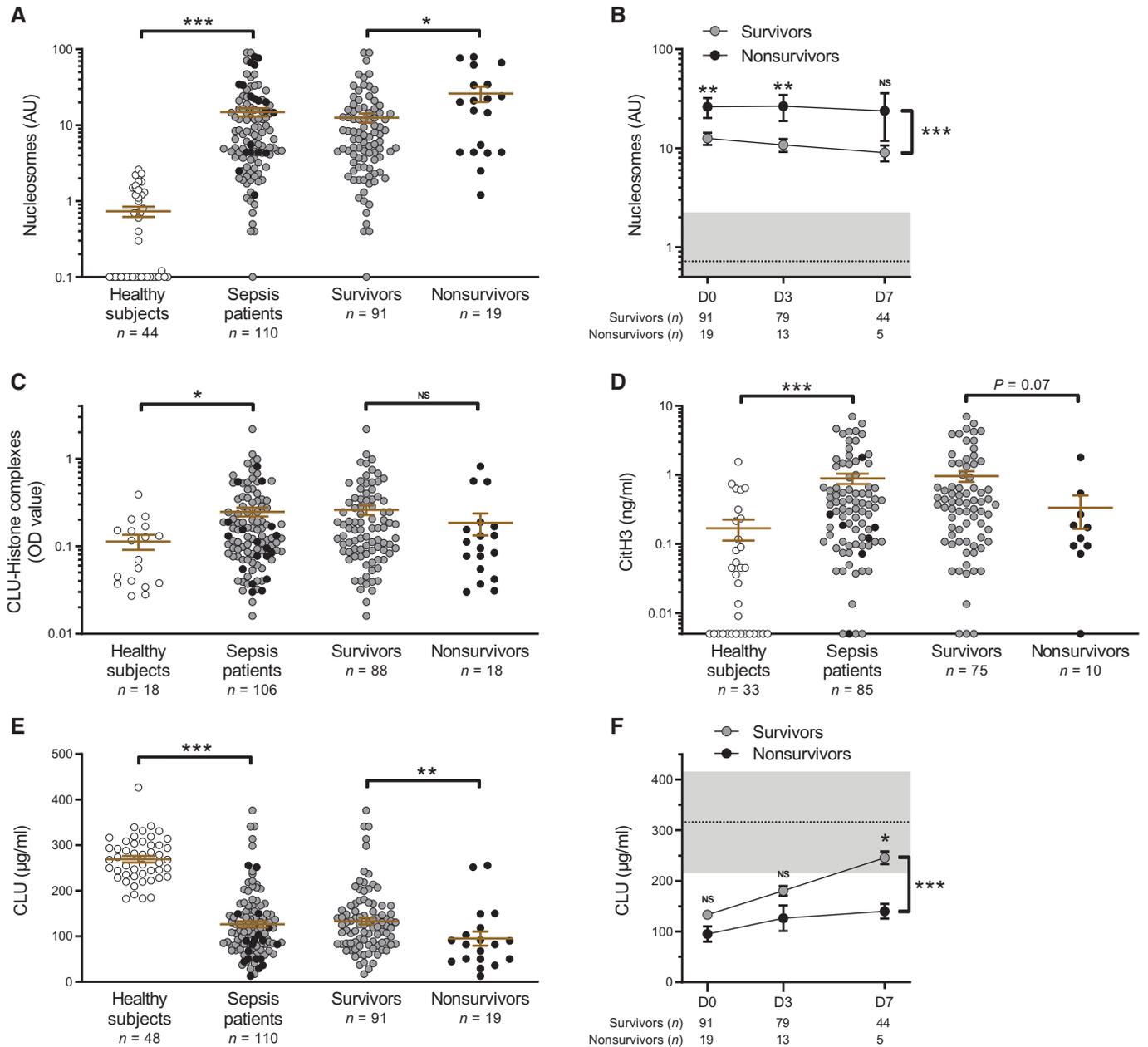


Figure 4. Clusterin (CLU)-histone complexes are associated with the survival of patients with sepsis. (A and C–E) The levels of nucleosomes (A), CLU-histone complexes (C), CitH3 (D), and CLU (E) were determined in the plasma of healthy subjects (open circles) and of surviving (gray circles) and nonsurviving (solid black circles) patients with sepsis at the time of admission to ICU on Day (D) 0. (B and F) The levels of nucleosomes (B) and CLU (F) were determined in the plasma of surviving and nonsurviving patients with sepsis at D0, D3, and D7 postadmission to the ICU. The dotted line above the x-axis represents the mean level of nucleosomes in healthy subjects; the gray shaded area indicates mean \pm (2 \times SD). For (A)–(F), the number of subjects in each group is indicated. Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test (A, C, D, and E) or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test (B and F). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. NS = not significant.

(CLP) (Figure 7B). However, CLU was early and transiently increased in CLP (Figure 7B), probably resulting from surgery-induced inflammation. We, therefore, evaluated the therapeutic potential of CLU supplementation in mice subjected to

CLP. The intravenous injection of CLU significantly reduced mouse mortality (Figure 7C). Finally, to confirm the protective role of endogenous CLU, we compared the sensitivity of wild-type (Clu^{+/+}) and Clu^{-/-} mice to endotoxemia

and to CLP (subjected to one or two cecal punctures). Survival was reduced in Clu^{-/-} mice compared with Clu^{+/+} mice that were subjected to two cecum punctures (Figure 7D). More precisely, among 72 mice that underwent CLP (41 Clu^{+/+} and 31

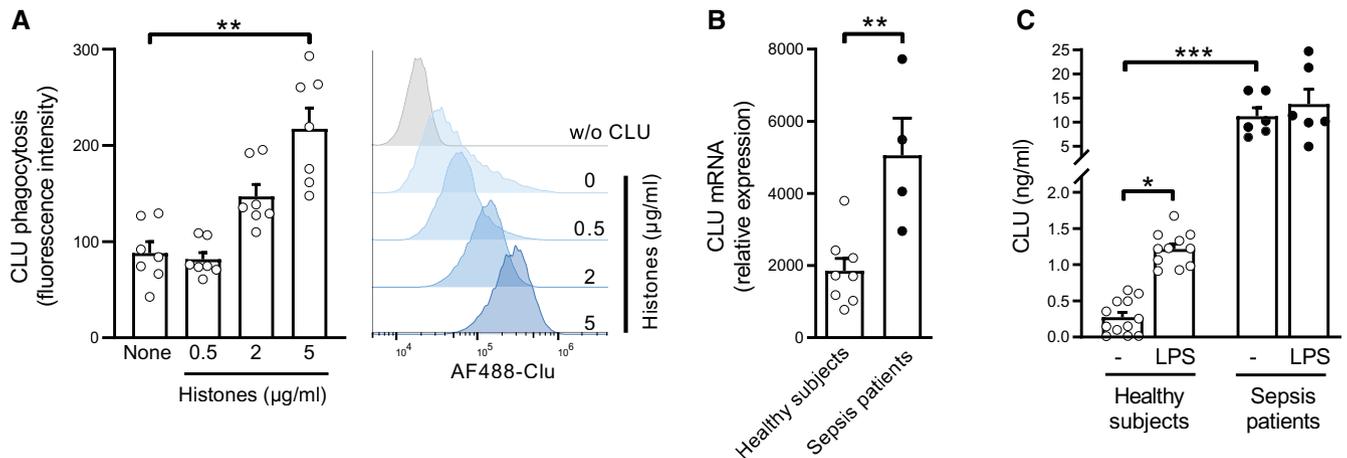


Figure 5. Clusterin (CLU) facilitates histone clearance and is overexpressed in patients with sepsis. (A) AF488-labeled CLU (AF488-CLU; 1 µg/ml) was complexed with the indicated amounts of histone before incubation for 1 hour with human macrophages. The phagocytosis of complexes was monitored by flow cytometry. Results are expressed as relative fluorescence intensity ($n = 7$); representative phagocytosis histograms are shown. Open circles represent healthy subjects, and solid circles represent patients with sepsis. (B) The expression of CLU mRNA by freshly isolated and nonstimulated monocytes from healthy subjects ($n = 8$) and from patients with sepsis ($n = 4$) was determined by using qRT-PCR. (C) CLU levels were quantified in the supernatants of monocytes from healthy subjects and from patients with sepsis, either stimulated or not stimulated for 6 hours with LPS ($n = 6-12$). Statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test (A and C) or the Mann-Whitney test (B). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

Clu^{-/-} mice), 9 were still alive at Day 15 (7 Clu^{+/+} and 2 Clu^{-/-} mice), 29 died from CLP (17 Clu^{+/+} and 12 Clu^{-/-} mice), and 34 were killed (17 Clu^{+/+} and 17 Clu^{-/-} mice). Similar results were observed in mice subjected to endotoxemia (Figure 7E) or to one cecum puncture CLP (see Figure E10). Of note, sham surgery did not impact the survival of Clu^{-/-} compared with Clu^{+/+} mice (Figures 7D and E10).

Discussion

Extracellular histones have emerged as critical inducers of tissue injury in severe diseases (48, 49), and their neutralization is protective in models of diseases associated with extensive cell death. In this study, we identified CLU as a pivotal endogenous molecule that neutralizes the inflammatory, thrombotic, and cytotoxic properties of

extracellular histones. In addition, we showed that the binding of CLU to extracellular histones occurs in patients with sepsis and that a sustained drop in CLU levels is associated with an increase in mortality. Finally, we demonstrated that restoring CLU levels represents a promising therapy to improve the outcome of patients with sepsis.

We observed that the levels of circulating CLU were significantly decreased

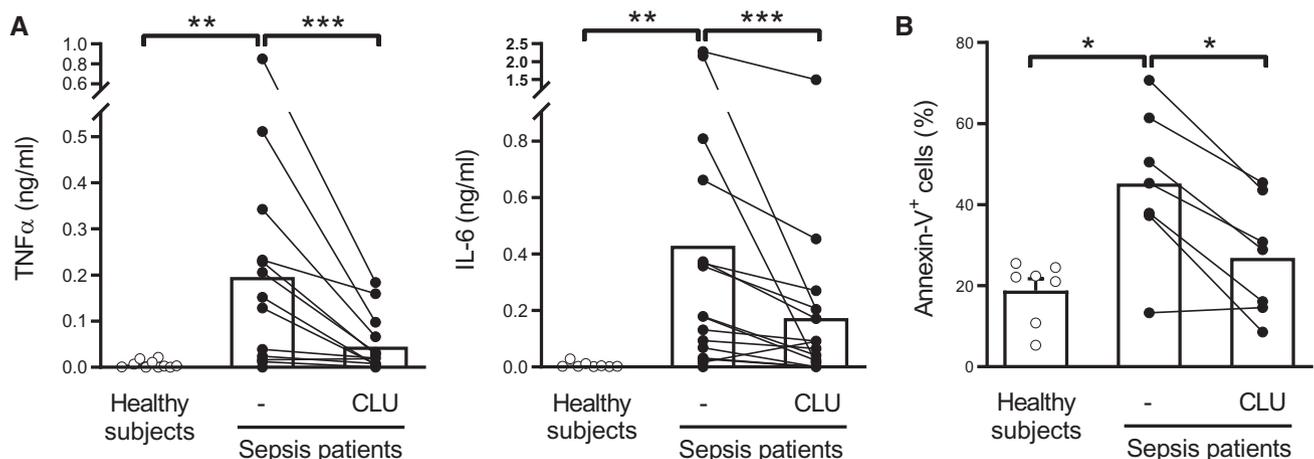


Figure 6. The inflammatory and cytotoxic activities of plasma from patients with sepsis are inhibited by the addition of CLU. (A and B) Monocytes from healthy subjects were cultured in medium containing 10% plasma from healthy subjects (open circles; $n = 7-10$) or from patients with sepsis and supplemented or not supplemented with 50 µg/ml CLU (solid circles; $n = 14-18$). After 24 hours, TNF- α and IL-6 were quantified by ELISA in the cell culture supernatants (A), and cell viability was monitored by flow cytometry (B). Results are expressed as percentage of annexin-V⁺ cells ($n = 7$). Statistical significance was determined using the Mann-Whitney test between healthy subjects and patients with septic shock and the Wilcoxon matched-pairs test between patients with sepsis (dots connected with lines). Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$. TNF- α = tumor necrosis factor alpha.

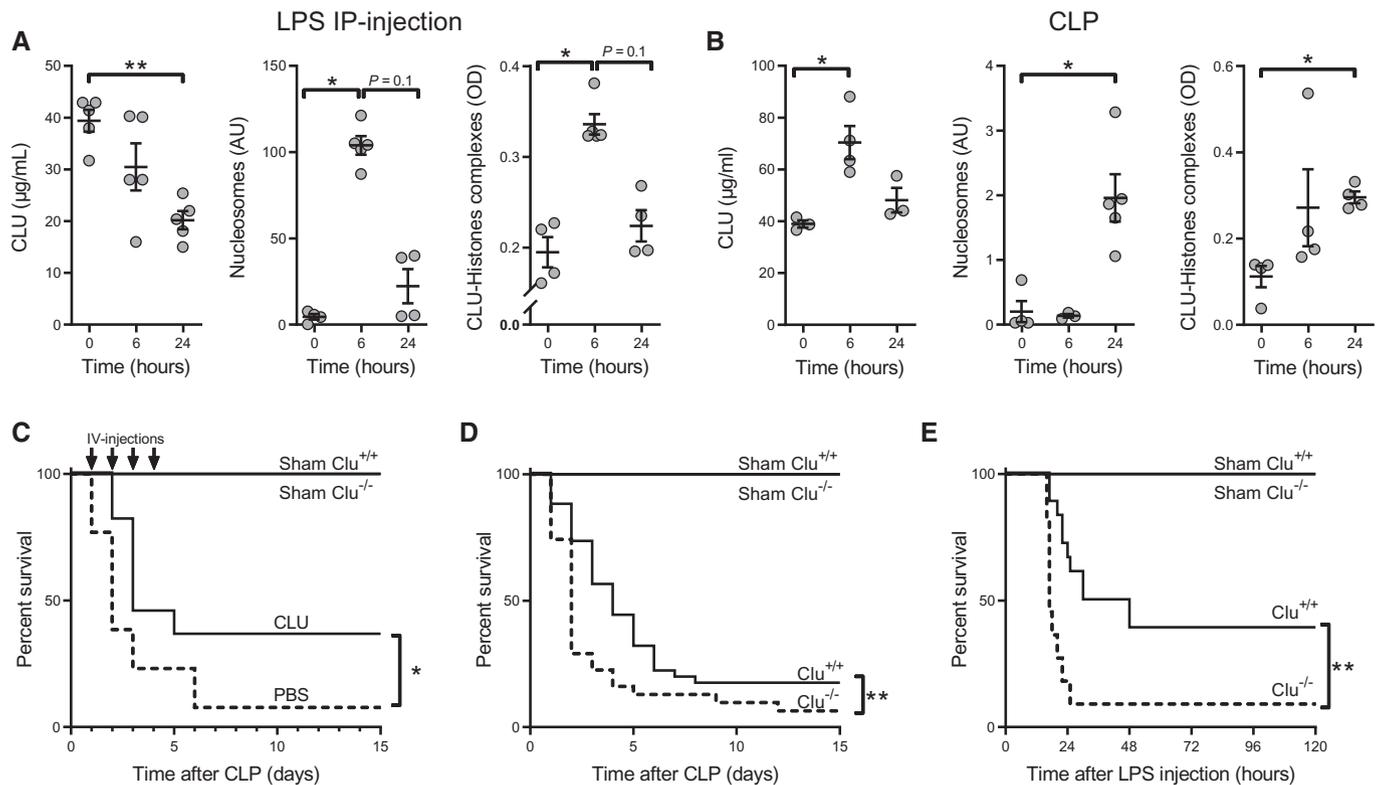


Figure 7. The nonredundant protective role of clusterin (CLU) in endotoxemia and sepsis models. (A and B) Wild-type mice ($n = 4\text{--}5$) were injected IP with 50 mg/kg LPS (A) or subjected to cecal ligation puncture (CLP) (B), and the levels of CLU, nucleosomes, and CLU-histone complexes were determined at injection and at 6 and 24 hours postinjection. (C) Overall survival of wild-type mice subjected to CLP (two-cecum puncture) and injected at Days 1, 2, 3, and 4 with 200 µg recombinant mouse CLU or PBS ($n = 12$ mice per group). (D and E) Overall survival of wild-type ($Clu^{+/+}$) and $Clu^{-/-}$ mice subjected to two-cecum puncture CLP (D; $n = 17$ mice per group) or injected intraperitoneally with 75 mg/kg LPS (E; $n = 15$ mice per group). For (C)–(E), survival curves were computed using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. For (A) and (B), statistical significance was determined using a Welch ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$, and ** $P < 0.01$. IP = intraperitoneally; OD = optical density; PBS = phosphate-buffered saline.

in patients with sepsis. This result is in agreement with observational studies reporting that CLU is decreased in nonsurvivors (50–52) and elevated in survivors (51, 53, 54). Although not superimposable to these studies, our results confirm that the survival of patients with sepsis is associated with maintenance of CLU to normal levels. Unfortunately, the design of our study excluded investigating CLU at later times after recovery. It is important to note that monocytes from patients with sepsis expressed elevated levels of CLU, suggesting that its decrease in plasma may not result from a reduced expression but rather from a consumption, consecutive to a prolonged release of histones by damaged tissues. This result is in agreement with a study reporting the emergence of a subset of CLU^{high} monocytes in patients with sepsis (55). One can hypothesize that these cells could represent one of the disease-relevant CLU-producing cell types.

CLU limits the severity of tissue damage in various diseases, such as autoimmune myocarditis, ischemia reperfusion, and neuroinflammation (29, 31–34). Our results provide evidence that the protective role of CLU could rely on its capacity to inhibit histones. Indeed, $Clu^{-/-}$ mice are more sensitive than wild-type mice to experimental endotoxemia and sepsis, and the administration of CLU decreased histone-induced lethality and reduced mortality in an experimental model of sepsis in wild-type mice. This result is in agreement with the fact that CLU-transgenic mice are more resistant to sepsis than wild-type mice (56).

The capacity of CLU to protect against the deleterious properties of extracellular histones (e.g., inflammation, platelet aggregation, cytotoxicity) appears related to the formation of CLU-histone complexes, thanks to the chaperone activity of CLU. These complexes may probably act by inhibiting their ability to interact with cell

membranes or by facilitating their clearance, at least by macrophages. Whether cells other than macrophages may eliminate these complexes remains to be evaluated. Of specific interest, the binding capacity of CLU to client molecules is enhanced in an acidic milieu (57), a condition commonly observed during sepsis (58).

In agreement with previous studies (59–61), we detected the presence of both CitHis and noncitrullinated histones in patients with sepsis, which levels were associated with the severity of the disease. These danger molecules, reflect the cell death processes that occur during sepsis (apoptosis and NETosis, respectively), explaining the presence of both forms of histones in the bloodstream of patients with sepsis. Results show that CLU neutralizes the inflammatory and cytotoxic activities of both forms of histones, suggesting that it may be protective in diseases associated with NETosis and/or apoptosis, as reported in sepsis models (62).

Albumin (12), thrombomodulin (21), heparins (18, 19), CRP, and PTX3 (15, 23) exhibit histone-binding properties. Some of these molecules, such as PTX3 and CRP (24, 25, 63), are overexpressed during sepsis, correlate with a higher risk of death (25, 63), and are protective in experimental endotoxemia and sepsis (15, 64). These data suggest that their increase is not sufficient to compensate for the decrease of CLU during sepsis. In our study, the levels of CLU correlated with all the parameters used to assess sepsis severity. Moreover, reduced levels of CLU were associated with death in two independent cohorts of patients; studies on larger cohorts of patients with sepsis are necessary to clinically validate this observation. This result, which identifies CLU as a major histone-binding protein relevant to disease progression, is reinforced by the fact that CLU-depleted plasma was less effective in reducing histone-induced inflammation and cell death than nondepleted plasma and that using CLU to supplement plasma from patients with sepsis reduced their inflammatory and cytotoxic properties. Collectively, these data showed that, among histone-binding molecules, CLU is unique in scavenging extracellular

histones, as none of the other histone-binding molecules compensate for a drop of CLU in sepsis. It is interesting that the variations of CLU levels observed in patients with sepsis were similar to that of the histone-binding molecule APC (65, 66). However, CLU and APC differ in the way they neutralize extracellular histones (scavenging vs. proteolysis) (3, 27). Although clinical trials evaluating the therapeutic potential of APC in sepsis gave contradictory results with, in some cases, severe complications (67), the infusion of exogenous CLU to restore its physiological concentrations may represent a safe approach to treat sepsis.

Sepsis has been defined as a dysregulated response to infection, leading to tissue damage (41). It is now well accepted that sepsis-induced organ dysfunction results also from the incapacity of the host to maintain or restore tissue homeostasis (68, 69). Neutralizing endogenous danger signals generated during sepsis, including histones, is essential to prevent tissue destruction. Our study identifies CLU as a novel endogenous inhibitor of histones and highlights a central role for CLU in the innate host protection system guarding

against histone-mediated injury. One can anticipate that such protective functions of CLU may be also observed in other diseases associated with tissue destruction. Notably, this study suggests that normalizing the levels of CLU through continuous infusion or regular bolus injections could represent an effective treatment for patients suffering from pathologies associated to the release of histones by injured tissues. ■

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

Acknowledgment: The authors sincerely acknowledge Sonia Salle, Luc Frey, members of the animal facility and of the cytometry and qPCR facility of the University of Angers for expert technical assistance. The authors also acknowledge Dr. Carmelo Di Primo (European Institute of Chemistry and Biology, University of Bordeaux) and Mr. Mike Maillason (Impact facility, Nantes University, Nantes, France) for surface plasmon resonance experiments. This work was performed in the context of the LabEX IGO program, supported by the National Research Agency through the investment for the future program ANR-11-LABX-0016-01, and of the integrated research program 3I-Impact, supported by the University of Angers and the University Hospital of Angers.

References

- Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2020;20:95–112.
- Zeerleder S, Zwart B, Willemin WA, Aarden LA, Groeneveld AB, Caliezi C, et al. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med* 2003;31:1947–1951.
- Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009;15:1318–1321.
- Zeerleder S, Stephan F, Emonts M, de Kleijn ED, Esmon CT, Varadi K, et al. Circulating nucleosomes and severity of illness in children suffering from meningococcal sepsis treated with protein C. *Crit Care Med* 2012;40:3224–3229.
- Ekane ML, Otto GP, Sossdorf M, Sponholz C, Boehringer M, Loesche W, et al. Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Crit Care* 2014;18:543.
- Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, et al. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:160–169.
- Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology* 2011;54:999–1008.
- Huang H, Chen HW, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, et al. Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J Immunol* 2013;191:2665–2679.
- Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, Mulay SR, Hägele H, Lichtnekert J, et al. Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1375–1388.
- Pisetsky DS. Immune activation by histones: pluses and minuses in inflammation. *Eur J Immunol* 2013;43:3163–3166.
- Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost* 2011;9:1795–1803.
- Lam FW, Cruz MA, Leung HC, Parikh KS, Smith CW, Rumbaut RE. Histone induced platelet aggregation is inhibited by normal albumin. *Thromb Res* 2013;132:69–76.
- Xu J, Zhang X, Monestier M, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J Immunol* 2011;187:2626–2631.
- Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 2012;7:e32366.
- Daigo K, Nakakido M, Ohashi R, Fukuda R, Matsubara K, Minami T, et al. Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis. *Sci Signal* 2014;7:ra88.
- Raffray L, Douchet I, Augusto JF, Youssef J, Contin-Bordes C, Richez C, et al. Septic shock sera containing circulating histones induce dendritic cell-regulated necrosis in fatal septic shock patients. *Crit Care Med* 2015;43:e107–e116.
- Kusano T, Chiang KC, Inomata M, Shimada Y, Ohmori N, Goto T, et al. A novel anti-histone H1 monoclonal antibody, SSV monoclonal antibody, improves lung injury and survival in a mouse model of lipopolysaccharide-induced sepsis-like syndrome. *BioMed Res Int* 2015;2015:491649.
- Wildhagen KCAA, García de Frutos P, Reutelingsperger CP, Schrijver R, Aresté C, Ortega-Gómez A, et al. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood* 2014;123:1098–1101.
- Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, Tabe Y, Kadota K, Sato K. Heparins attenuated histone-mediated cytotoxicity in vitro and improved the

- survival in a rat model of histone-induced organ dysfunction. *Intensive Care Med* 2015;3:36.
20. Schouten M, van 't Veer C, Poulussen N, Meijers JC, Levi M, Esmon CT, et al. The cytoprotective effects of endogenous activated protein C reduce activation of coagulation during murine pneumococcal pneumonia and sepsis. *Thromb Res* 2015;135:537–543.
 21. Nakahara M, Ito T, Kawahara K, Yamamoto M, Nagasato T, Shrestha B, et al. Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. *PLoS One* 2013;8:e75961.
 22. Wygrecka M, Kosanovic D, Wujak L, Reppe K, Henneke I, Frey H, et al. Antihistone properties of C1 esterase inhibitor protect against lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:186–199.
 23. Abrams ST, Zhang N, Dart C, Wang SS, Thachil J, Guan Y, et al. Human CRP defends against the toxicity of circulating histones. *J Immunol* 2013;191:2495–2502.
 24. Mauri T, Bellani G, Patroniti N, Coppadoro A, Peri G, Cuccovillo I, et al. Persisting high levels of plasma pentraxin 3 over the first days after severe sepsis and septic shock onset are associated with mortality. *Intensive Care Med* 2010;36:621–629.
 25. Caironi P, Masson S, Mauri T, Bottazzi B, Leone R, Magnoli M, et al.; ALBIOS Biomarkers Study Investigators. Pentraxin 3 in patients with severe sepsis or shock: the ALBIOS trial. *Eur J Clin Invest* 2017;47:73–83.
 26. Wilson MR, Easterbrook-Smith SB. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* 2000;25:95–98.
 27. Wyatt AR, Yerbury JJ, Berghofer P, Greguric I, Katsifis A, Dobson CM, et al. Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:3919–3931.
 28. Wyatt AR, Yerbury JJ, Ecroyd H, Wilson MR. Extracellular chaperones and proteostasis. *Annu Rev Biochem* 2013;82:295–322.
 29. Zhou W, Guan Q, Kwan CC, Chen H, Gleave ME, Nguan CY, et al. Loss of clusterin expression worsens renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;298:F568–F578.
 30. Guo J, Guan Q, Liu X, Wang H, Gleave ME, Nguan CY, et al. Relationship of clusterin with renal inflammation and fibrosis after the recovery phase of ischemia-reperfusion injury. *BMC Nephrol* 2016;17:133.
 31. Nguan CYC, Guan Q, Gleave ME, Du C. Promotion of cell proliferation by clusterin in the renal tissue repair phase after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014;306:F724–F733.
 32. Kwon MJ, Ju TJ, Heo JY, Kim YW, Kim JY, Won KC, et al. Deficiency of clusterin exacerbates high-fat diet-induced insulin resistance in male mice. *Endocrinology* 2014;155:2089–2101.
 33. McLaughlin L, Zhu G, Mistry M, Ley-Ebert C, Stuart WD, Florio CJ, et al. Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *J Clin Invest* 2000;106:1105–1113.
 34. Newkirk MM, Apostolakis P, Neville C, Fortin PR. Systemic lupus erythematosus, a disease associated with low levels of clusterin/apoJ, an antiinflammatory protein. *J Rheumatol* 1999;26:597–603.
 35. Jenne DE, Lowin B, Peitsch MC, Böttcher A, Schmitz G, Tschopp J. Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. *J Biol Chem* 1991;266:11030–11036.
 36. Ataseven A, Kesli R, Kurtipek GS, Ozturk P. Assessment of lipocalin 2, clusterin, soluble tumor necrosis factor receptor-1, interleukin-6, homocysteine, and uric acid levels in patients with psoriasis. *Dis Markers* 2014;2014:541709.
 37. Kropáčková T, Vernerová L, Storkánová H, Horváthová V, Vokurková M, Klein M, et al. Clusterin is upregulated in serum and muscle tissue in idiopathic inflammatory myopathies and associates with clinical disease activity and cytokine profile. *Clin Exp Rheumatol* 2021;39:1021–1032.
 38. Won JC, Park CY, Oh SW, Lee ES, Youn BS, Kim MS. Plasma clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation. *PLoS One* 2014;9:e103351.
 39. Cunin P, Beauvillain C, Miot C, Augusto JF, Preisser L, Blanchard S, et al. Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses. *Cell Death Dis* 2016;7:e2215.
 40. Radic M, Marion T, Monestier M. Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *J Immunol* 2004;172:6692–6700.
 41. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 2016;315:801–810.
 42. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 2009;184:205–213.
 43. Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 2008;180:1895–1902.
 44. Leshner M, Wang S, Lewis C, Zheng H, Chen XA, Santy L, et al. PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol* 2012;3:307.
 45. Zhang Y, Wu C, Li L, Pandeya A, Zhang G, Cui J, et al. Extracellular histones trigger disseminated intravascular coagulation by lytic cell death. *Int J Mol Sci* 2022;23:6800.
 46. Chen Q, Ye L, Jin Y, Zhang N, Lou T, Qiu Z, et al. Circulating nucleosomes as a predictor of sepsis and organ dysfunction in critically ill patients. *Int J Infect Dis* 2012;16:e558–e564.
 47. Brandtzaeg P, Osnes L, Ovstebø R, Jøø GB, Westvik AB, Kierulf P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 1996;184:51–60.
 48. Xu Z, Huang Y, Mao P, Zhang J, Li Y. Sepsis and ARDS: the dark side of histones. *Mediators Inflamm* 2015;2015:205054.
 49. Li Y, Wan D, Luo X, Song T, Wang Y, Yu Q, et al. Circulating histones in sepsis: potential outcome predictors and therapeutic targets. *Front Immunol* 2021;12:650184.
 50. Høgåsen K, Mollnes TE, Brandtzaeg P. Low levels of vitronectin and clusterin in acute meningococcal disease are closely associated with formation of the terminal-complement complex and the vitronectin-thrombin-antithrombin complex. *Infect Immun* 1994;62:4874–4880.
 51. DeCoux A, Tian Y, DeLeon-Pennell KY, Nguyen NT, de Castro Brás LE, Flynn ER, et al. Plasma glycoproteomics reveals sepsis outcomes linked to distinct proteins in common pathways. *Crit Care Med* 2015;43:2049–2058.
 52. Garcia-Obregon S, Azkargorta M, Seijas I, Pilar-Orive J, Borrego F, Elortza F, et al. Identification of a panel of serum protein markers in early stage of sepsis and its validation in a cohort of patients. *J Microbiol Immunol Infect* 2018;51:465–472.
 53. Kalenka A, Feldmann RE Jr, Otero K, Maurer MH, Waschke KF, Fiedler F. Changes in the serum proteome of patients with sepsis and septic shock. *Anesth Analg* 2006;103:1522–1526.
 54. Bauer M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kortgen A, Möller E, Felsmann K, Cavaillon JM, et al. A transcriptomic biomarker to quantify systemic inflammation in sepsis—a prospective multicenter phase II diagnostic study. *EBioMedicine* 2016;6:114–125.
 55. Reyes M, Filbin MR, Bhattacharyya RP, Billman K, Eisenhaure T, Hung DT, et al. An immune-cell signature of bacterial sepsis. *Nat Med* 2020;26:333–340.
 56. Dias AA, Goodman AR, Dos Santos JL, Gomes RN, Altmeyer A, Bozza PT, et al. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. *J Leukoc Biol* 2001;69:928–936.
 57. Poon S, Rybchyn MS, Easterbrook-Smith SB, Carver JA, Pankhurst GJ, Wilson MR. Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin. *J Biol Chem* 2002;277:39532–39540.
 58. Lee S-W, Hong YS, Park DW, Choi SH, Moon SW, Park JS, et al. Lactic acidosis not hyperlactatemia as a predictor of in hospital mortality in septic emergency patients. *Emerg Med J* 2008;25:659–665.
 59. Hirose T, Hamaguchi S, Matsumoto N, Irisawa T, Seki M, Tasaki O, et al. Presence of neutrophil extracellular traps and citrullinated histone H3 in the bloodstream of critically ill patients. *PLoS One* 2014;9:e111755.
 60. Hampson P, Dinsdale RJ, Wearn CM, Bamford AL, Bishop JRB, Hazeldine J, et al. Neutrophil dysfunction, immature granulocytes, and cell-free DNA are early biomarkers of sepsis in burn-injured patients: a prospective observational cohort study. *Ann Surg* 2017;265:1241–1249.
 61. Claushuis TAM, van der Donk LEH, Luitse AL, van Veen HA, van der Wel NN, van Vught LA, et al. Role of peptidylarginine deiminase 4 in

- neutrophil extracellular trap formation and host defense during *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia-derived sepsis. *J Immunol* 2018;201:1241–1252.
62. Li Y, Liu Z, Liu B, Zhao T, Chong W, Wang Y, *et al.* Citrullinated histone H3: a novel target for the treatment of sepsis. *Surgery* 2014;156:229–234.
63. Meisner M, Tschaikowsky K, Palmaers T, Schmidt J. Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Crit Care* 1999;3:45–50.
64. Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2575–2580.
65. Shorr AF, Bernard GR, Dhainaut JF, Russell JR, Macias WL, Nelson DR, *et al.* Protein C concentrations in severe sepsis: an early directional change in plasma levels predicts outcome. *Crit Care* 2006;10:R92.
66. Yan SB, Helderbrand JD, Hartman DL, Wright TJ, Bernard GR. Low levels of protein C are associated with poor outcome in severe sepsis. *Chest* 2001;120:915–922.
67. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, *et al.*; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344:699–709.
68. Medzhitov R. Septic shock: on the importance of being tolerant. *Immunity* 2013;39:799–800.
69. Medzhitov R, Schneider DS, Soares MP. Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 2012;335:936–941.

Titre : L'interleukine 34 exprim e dans le pancréas régule l'inflammation locale.

Mots clés : interleukine 34, inflammation, métabolisme, pancréas, insuline.

Résumé : L'interleukine 34 est une cytokine décrite comme un second ligand pour le récepteur au M-CSF, CD115. Elle a été identifi e comme majoritairement produite au niveau de la peau et du cerveau où elle participe à la maintenance des cellules de Langerhans et de la microglie, respectivement. L'IL-34 est identifi e comme surexprim e dans de nombreuses pathologies inflammatoires.

Dans notre étude, nous avons observ e une expression constitutive de l'IL-34 dans les îlots de Langerhans humains et murins. L'analyse des effets de l'inactivation du gène de *Il34* dans les cellules β dans un modèle de souris mise en place au laboratoire (IL-34^{Δpdx}) a mis en évidence un rôle de la cytokine dans l'immunité locale.

En vieillissant, les souris IL-34^{Δpdx} présentent une altération de la tolérance au glucose associ e à une inflammation locale plus prononcée que les souris contrôles. Ce phénotype est exacerbé quand les souris sont soumises à un régime riche en graisse et en sucre. La sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans des souris contrôles est alt r e en présence de cytokines pro-inflammatoires. L'ajout d'IL-34 restaure la sécrétion d'insuline. En outre, la production d'IL-34 est augment e chez les patients diabétiques de type 2.

Ces résultats suggèrent que l'IL-34 synth tis e localement dans les îlots de Langerhans aurait un rôle protecteur dans un contexte inflammatoire chronique.

Title: Interleukin-34 expressed in the pancreas regulates local inflammation.

Keywords: interleukin-34, inflammaging, metaflammation, pancreas, insulin.

Abstract: Interleukin 34 (IL-34) is a cytokine described as a second ligand for the M-CSF receptor, CD115. IL-34 has been identified as predominantly produced in the skin and brain, where it is involved in the maintenance of Langerhans cells and microglia. IL-34 has been identified as overexpressed in several inflammatory pathologies.

In our study, we observed a constitutive expression of IL-34 in human and murine Langerhans islets. Analysis of *Il34* gene inactivation effects in β cells in a mouse model (IL-34^{Δpdx}) highlighted a role for the cytokine in local immunity.

As they aged, IL-34^{Δpdx} mice showed impaired glucose tolerance associated with more pronounced local inflammation than control mice. This phenotype is exacerbated when mice are subjected to a high-fat diet. Insulin secretion from the islets of control mice is impaired in the presence of pro-inflammatory cytokines. The addition of IL-34 restores insulin release. Moreover, IL-34 production is increased in type 2 diabetic patients.

These results support the idea of a protective role for IL-34 locally in pancreatic islets in a chronic inflammatory context.