



HAL
open science

Rôle des cellules de Kupffer dans l'homéostasie du cholestérol

Rebecca Fima

► **To cite this version:**

Rebecca Fima. Rôle des cellules de Kupffer dans l'homéostasie du cholestérol. Sciences du Vivant [q-bio]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT: . tel-04040858v1

HAL Id: tel-04040858

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-04040858v1>

Submitted on 22 Mar 2023 (v1), last revised 10 May 2023 (v2)

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale ED394 Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Institute of Cardiometabolism and Nutrition

Mononuclear Phagocytes in Cardiometabolic diseases

INSERM UMRS1166

Rôle des Cellules de Kupffer dans l'homéostasie du cholestérol

par

Rebecca FIMA

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par le Dr Thierry HUBY

Présentée publiquement le 22 Septembre 2022

Devant un jury composé de :

Pr Chantal HOUSSET

Présidente

Dr Nicolas VENTECLEF

Rapporteur

Dr Thomas GAUTIER

Rapporteur

Dr Xavier PRIEUR

Examineur

Dr Alexandre BOISSONNAS

Examineur

Dr Thierry HUBY

Directeur de thèse

*A mes grands-parents d'ici et de là-haut qui
doivent être bien fiers de voir se dessiner
quelques blouses blanches dans le clan Fima*

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier Madame et Messieurs les membres du jury d'avoir porté de l'intérêt pour mon projet de recherche et d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail.

Ma profonde reconnaissance va à mon directeur de thèse, le Dr Thierry Huby. Au cours de ces 5 années à travailler à tes côtés et dès mon master, j'ai appris une science de qualité, pointilleuse, exigeante et honnête. Je te remercie d'avoir cru en moi, de m'avoir portée jusqu'au concours et d'avoir mis à disposition les moyens nécessaires à la bonne réalisation de ce projet. Aussi pour ta pédagogie, tes remarques bienveillantes, tes encouragements et ta disponibilité. Je n'oublierai pas que tu es de ceux qui laissent une place à la vie, celle en dehors du labo.

Je remercie également le Dr Emmanuel Gautier autant pour ses remarques scientifiques pertinentes qui font murir les projets, que pour les légèretés au déjeuner.

Pour ceux qui sont du milieu, ne vous a-t-on jamais dit « tu cherches, mais est-ce que tu trouves ? » ? Pour ma part j'ai trouvé Adélaïde. Mon amie et ex-collègue. Une de mes grandes motivations ces dernières années. Merci pour ton soutien inconditionnel, tes encouragements, ta disponibilité, tes exigences, ta droiture, ton courage, nos rires, nos galères. Merci d'accepter et de comprendre si simplement nos différences. Nos chemins de vie se recroiseront ! En attendant vive la technologie !

Martine, avec ton (gros) lot de connaissances, ton professionnalisme et tes remarques pleines de bons sens, tu as fait jaillir de jolis résultats et nous a aidés à relativiser les moins bons. Merci pour tous ces moments d'écoute et de partage à la paillasse, dans le couloir ou au bureau. Ça a été un honneur d'accompagner tes dernières années de parcours professionnel. Comme un bon vin, tu es arrivée à maturité. Profite, sans souci d'aucun ordre et en pleine santé !

Seb, tu nous as sauvés plus d'une fois ! Merci pour tous ces moments dans notre bocal, nos partages et nos confidences entre écrans interposés et nos repas au parc. Aussi de m'avoir fait découvrir ta passion.

On se suit depuis la licence avec Ines. Je n'oublierai jamais ce fou rire en master !
Merci pour nos pauses thé-gâteaux, nos discussions de tout ordre (mais toujours dans l'objectif de se réunir) et le soutien qu'on s'est apporté. Pour la suite, partons du principe que le mercredi n'existe plus !

Haoussa, je te remercie particulièrement pour ces derniers mois où on s'est retrouvées ensemble dans les derniers moments de la thèse.

Cheima, une ex-stagiaire devenue collègue. Des lignes en plus sur un CV et une jeune femme qui éclot. Je te souhaite de t'épanouir chaque jour un peu plus.

Alexandre, je ne te remercierai jamais assez pour la finesse avec laquelle tu as su détecter mes peines et mes joies. Ta disponibilité et nos échanges apaisants. Prends soin de toi et tout le meilleur.

J'adresse mes remerciements à Philippe C pour ses nombreuses attentions, mais aussi à Will, Maryse et Philippe L pour leurs encouragements.

Je pense aussi au reste de la team étudiante et notamment à Caroline (le rayon de soleil de ces derniers mois), Raoul, Alice, Pukar, Clément et bien sûr Margault. Je vous souhaite beaucoup de réussite dans vos projets scientifiques et personnels.

Mes pensées vont aussi aux nombreuses stagiaires que j'ai encadrées. Gabrielle, Sankeetha, Elsa, Hiba, Assia, Claudia, Cheima et Merve. En dehors de l'aide que vous avez apportée dans la construction du projet, vous m'avez permis de réaliser une de mes passions : transmettre. Alors merci !

Je tiens tout particulièrement à remercier Estelle. Pour ta disponibilité, ton efficacité, ton aide et ton écoute. Je souhaite que tes vœux les plus chers se réalisent dans la paix.

Je remercie aussi Olga, Roberte et Angélique pour leur présence rassurante et leur gentillesse.

Mes remerciements au personnel animalier, notamment à Aurélie qui a su prendre soin de nos animaux tout au long du projet.

Je n'oublie pas Amélie, Elissa, Léonie, Lucie et bien sûr Lisou que je retrouve avec bonheur l'hiver et l'été autour d'un café/brioche/chouquettes (ça va me manquer).

Pour aller jusqu'en doctorat, il fallait de la volonté, de la passion et de la détermination. J'adresse donc de chaleureuses pensées à ma professeur d'SVT de lycée Mme Neuberg, à mes professeurs d'université et à Céline qui a encadré mon premier stage en laboratoire en licence. Ils ont su faire naître en moi les prémices de la scientifique que je suis aujourd'hui.

Une thèse c'est tout un parcours. Avec soutien et amour c'est bien plus facile.

C'est pourquoi je remercie mes amis de toujours Audélia et Marvin. Pour avoir accepté mes absences, et pour votre présence. Je remercie aussi Hanna, Simon, Manu, Cindy, Sarah, Mouchki et Raphaëlle pour vos encouragements et votre soutien.

Je remercie aussi mes cousines adorées Rosalie et Yael.

Mes pensées vont bien évidemment vers Raphaël. Tu es arrivé vers la fin de mon parcours doctoral, quand l'effervescence des expérimentations allait laisser place à une période moins dynamique et plus stable. Mais tu as compris combien ce projet comptait pour moi. Merci pour tes tendres encouragements, ton chez toi ensoleillé de 12h à 12h35, de croire en moi et de me pousser à être à la hauteur de ce que je suis.

Enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements à ma famille. A ma sœur Esther pour ton soutien, ton dévouement et ton abnégation. A mes petits frères Noam et Raphaël d'être fiers de moi, de m'encourager et de me faire rire. Aussi à ma grand-mère chérie, mon oncle Eric, mon beau-frère Kevin et Natane, une petite lumière dans la vie.

A mes parents, d'être si dévoués, disponibles et aimants.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
SOMMAIRE	5
LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES TABLES ET FIGURES	11
INTRODUCTION.....	12
PARTIE 1 : HYPERCHOLESTEROLEMIE ET ATHEROSCLEROSE... 12	
I. Le cholestérol et ses excès	12
1. Cholestérol	12
2. Hypercholestérolémie	14
a. Généralités.....	14
b. Facteurs génétiques	15
c. Facteurs environnementaux: historique et émergence	16
d. Préventions et thérapeutiques.....	19
II. Évolutions physiopathologiques de l'athérosclérose.....	20
1. Généralités	21
2. Les macrophages : des acteurs clés de l'inflammation.....	23
a. le système immunitaire.....	23
i. Origine du système immunitaire.....	23
ii. Diversités des systèmes	24
b. Monocytes	25
i. Hétérogénéité.....	25
ii. Développement.....	26
iii. Monocytes non-classiques	28
iv. Monocytes classiques.....	29
c. Macrophages	31
i. Développement.....	31
ii. Hétérogénéité des macrophages résidents d'origine embryonnaire	33
iii. Hétérogénéité des macrophages dérivés des monocytes.....	34
3. Processus de l'athérosclérose.....	35
a. L'initiation.....	36

b.	Progression de la lésion.....	40
c.	Résolution et complications	45
4.	Comparatif homme/souris et modèles d'études.....	47
PARTIE 2 : LE FOIE : UN ORGANE MAJEUR DE L'HOMÉOSTASIE		
DU CHOLESTEROL.....		50
I.	Une structure au service de sa fonction.....	50
1.	Structure	50
a.	Développement.....	50
b.	Localisation	50
2.	Acteurs cellulaires.....	52
a.	Hépatocytes	52
b.	Les cellules étoilées.....	53
c.	Les cellules endothéliales.....	53
d.	Les cholangiocytes	54
e.	Les cellules immunitaires.....	54
3.	Fonctions	57
a.	Détoxification.....	57
b.	Endocrine	58
c.	Exocrine	58
d.	Immunitaire	59
e.	Métabolisme des vitamines	59
f.	Fonction énergétique	59
II.	Métabolisme du cholestérol	60
1.	Les lipoprotéines : des transporteurs de choix.....	60
2.	Apport exogène de cholestérol.....	61
3.	Synthèse endogène de cholestérol	61
4.	Transport inverse du cholestérol	62
5.	Excrétion du cholestérol	64
a.	Voies biliaires.....	64
b.	Voies non biliaires.....	65
PARTIE 3: LES CELLULES DE KUPFFER		67
I.	Homéostasie des KCs	67
1.	Ontogénie et localisation des KCs	67

2. Identification des KCs.....	69
3. Fonctions	73
a. Maintien d'une tolérance immunitaire et détoxification du sang.....	73
b. Elimination des plaquettes sénescentes	74
c. Implication dans le métabolisme du fer et des globules rouges	74
d. Métabolisme des lipides	75
4. Modèles d'étude des KCs	75
II. KCs et pathologies	76
1. Diversités des KCs	76
2. Réponses et implications des KCs en conditions physiopathologiques	79
a. KCs et lésions hépatiques aiguës	79
i. Présentation de l'ALI.....	79
ii. L'ALI par surconsommation médicamenteuse.....	80
iii. L'ALI par infection virale.....	82
b. KCs et lésions hépatiques chroniques	83
i. NASH	83
ii. Fibrose et hépatocarcinome	85
OBJECTIFS DE THESE.....	87
RESULTATS DU TRAVAIL DE RECHERCHE	89
DISCUSSION.....	119
VALORISATION DU TRAVAIL DE RECHERCHE.....	127
BIBLIOGRAPHIE	129

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
ACAT	acetyl-coA acetyltransferase 1
ALI	acute liver injury
APAP	acétaminophène
APO	Apolipoprotéine
<i>Bcl</i>	B-cell leukemia/lymphoma
BMP	bone morphogenetic protein
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand
CCR	C-C Motif Chemokine Receptor
CE	Cholestérol estérifié
CETP	cholesteryl ester transfer protein
CL	Cholestérol libre
CLD	chronic liver disease
CLEC2	c-type lectin-like receptor 2
CLEC4F	C-Type Lectin Domain Family 4 Member F
CML	Cellule musculaire lisse
CSF1	colony stimulating factor 1
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CX3C	C-X3-C motif chemokine
DAMP	damage associated molecular pattern
DC	Cellule dendritique
DT	Toxine diphtérique
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
emKC	KC embryonnaire
EPO	Erythropoïétine
FH	Hypercholestérolémie familiale
FPN1	ferroportine-1
GMP	granulocyte-monocyte progenitor
HCC	hépatocarcinome
HDL	High density lipoprotein
HSC	Hepatic stellate cell

ICAM	intercellular adhesion molecule
IL	Interleukine
KC	Cellule de Kupffer
LB	Lymphocyte B
LCM	Liver Capsular Macrophage
LDL	Low density lipoprotein
LDLc	Cholestérol associé aux LDL
LDLox	LDL oxydé
LDLR	Récepteur au LDL
LPL	Lipoprotein lipase
LRP	LDL-receptor related protein
LSEC	Liver Sinusoidal Endothelial Cell
LT	Lymphocyte T
MCV	Maladie cardio vaculaire
MDP	monocyte and dendritic cell progenitor
MEC	Matrice extracellulaire
MoDMac	Macrophage dérivé des monocytes
moKC	KC dérivée des monocyte
NASH	Non-Alcoholic SteatoHepatitis
NCP1L1	niemann-pick type c1 like 1
NET	neutrophil extracellular trap
NO	Nitric oxyde
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PRR	pattern recognition receptor
sRBC	senescent Red blood cell
RE	Réticulum endoplasmique
ResMac	Macrophage résident
ROS	Reactive oxygen species
SRA1	steroid receptor RNA activator 1
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
TG	Triglicéride
TGF	transforming growth factor
TIM4	T cell immunoglobulin and mucin domain containing 4
TLR	Toll like receptor

TNF	tumor necrosis factor
TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
VSIG4	v-set and immunoglobulin domain containing 4)

LISTE DES FIGURES ET TABLES

Figure 1 : Structure chimique du cholestérol	12
Figure 2 : Structure générale d'une lipoprotéine.....	13
Figure 3 : Photographie d'une plaque d'athérosclérose humaine après colorations.	22
Figure 4 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse adulte dans la moelle osseuse	25
Figure 5 : Développement des monocytes chez la souris	27
Figure 6 : Diversités des fonctions des monocytes en conditions physiologique et pathologique	31
Figure 7 : Lignées d'établissement de macrophages chez l'embryon et l'adulte	32
Figure 8 : Représentation schématique de la structure du mur artériel	36
Figure 9 : Mécanismes impliqués dans l'initiation de la lésion.....	37
Figure 10 : Mécanismes impliqués dans la progression de la lésion	40
Figure 11 : Voies d'induction de l'apoptose d'un macrophage au cours du stress du réticulum endoplasmique.....	42
Figure 12 : Rôle des lymphocytes T au cours de l'athérosclérose.....	44
Figure 13 : Mécanismes impliqués dans les lésions avancées.....	45
Figure 14 : Comparaison et origines des thromboses	47
Figure 15 : Grandes voies de la vascularisation hépatique	51
Figure 16 : Organisation fonctionnelle du foie	52
Figure 17 : Populations immunitaires au sein d'une triade hépatique.....	56
Figure 18 : Tableau récapitulatif de la composition des lipoprotéines	60
Figure 19 : Schéma des 3 voies du métabolisme du cholestérol.....	64
Figure 20 : Voies majeures du métabolisme du cholestérol dans une cellule polarisée telles que les entérocytes et hépatocytes	66
Figure 21 : Ontogénie des KCs au cours de l'embryogenèse chez la souris.....	68
Figure 22 : Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la génération de MoKCs.....	77
Table 1 : Classification des lésions d'athérosclérose	22
Table 2 : Marqueurs d'identification des KCs chez la souris et l'homme	72
Table 3 : Modèles d'études des KCs chez la souris	76
Table 4 : Comparaison des marqueurs d'identification entre les EmKCs et les MoKCs chez la souris.....	78

INTRODUCTION

Partie 1 : Hypercholestérolémie et athérosclérose

I. Le cholestérol et ses excès

1. Cholestérol

En 1815, le chimiste français Chevreul isole, dans des calculs biliaires humains, un solide blanc, cristallin et insoluble dans l'eau. Il l'appelle « cholestérine » du grec *cholé* « bile » et *steros* « solide » (Chevreul 1815). Durant la majeure partie du XIX^{ème} siècle, la cholestérine fait l'objet de nombreuses recherches afin de déterminer sa composition chimique et sa formule brute. En 1854, Berthelot identifie une fonction alcool et modifie le nom de la molécule en « cholestérol ». Après de nombreuses suggestions au sein de la communauté scientifique de l'époque, Reinitzer découvre en 1888 à Prague la formule brute du cholestérol : $C_{27}H_{46}O$.

C'est une molécule amphiphile, largement insoluble dans l'eau au niveau de sa chaîne carbonée, mais qui toutefois, possède un pôle hydrophile grâce à son groupement OH lui permettant de former des structures micellaires. Cependant, l'estérification de cette fonction alcool entraîne la formation d'ester de cholestérol (CE), une molécule complètement hydrophobe (*Figure 1*).

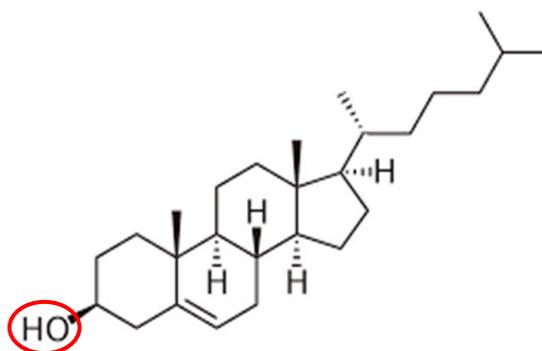


Figure 1 : Structure chimique du cholestérol

(Mise en évidence de la fonction alcool estérifiable, entourée en rouge)

Le cholestérol est présent chez la plupart des organismes animaux mais absent des végétaux et micro-organismes. On en trouve principalement dans les produits laitiers, la viande rouge, les abats, les œufs et les fruits de mer. Il est biosynthétisé par toutes les cellules chez les mammifères, est stocké dans les tissus sous forme de CE et est transporté dans le compartiment vasculaire au sein de structures qu'on appelle des lipoprotéines. Ce sont des complexes macromoléculaires à cœur hydrophobe composé de triglycérides (TG) et de CE. Leur surface polaire est constituée de phospholipides, de cholestérol libre (CL) et d'apolipoprotéines (Apo), des protéines qui jouent un rôle structural et participent à la régulation du métabolisme des lipoprotéines. Ce métabolisme fera l'objet d'une section entière en partie II. Parmi les différentes lipoprotéines existantes, la lipoprotéine de basse densité ou LDL (low-density lipoprotein) est celle qui contient la plus grande proportion de cholestérol (*Figure 2*).

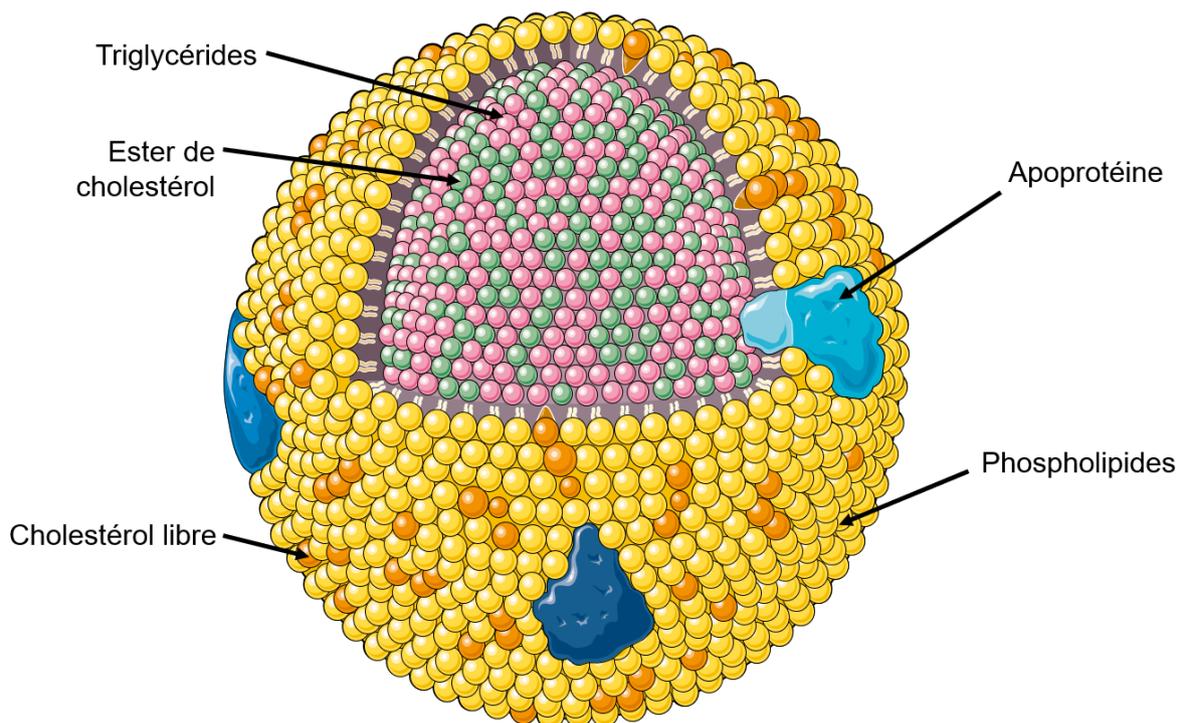


Figure 2 : Structure générale d'une lipoprotéine

Le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires. Associé aux phospholipides, il y est orienté de façon stricte, la tête apolaire du groupe OH tournée vers le milieu extérieur ou cytoplasmique alors que le noyau et la chaîne carbonée situés en profondeur dans la couche lipidique. Les membranes sont des structures dynamiques d'échanges moléculaires et ioniques dont les transferts se réalisent à

vitesses variables et en fonction de la fluidité membranaire. C'est le cholestérol qui module ce paramètre en régulant, par sa présence, la perméabilité des membranes. De plus, il se lie aux protéines transmembranaires et permet de maintenir ou modifier leur conformation. Enfin, le cholestérol interagit avec bon nombre de protéines de transport de stérol afin de faciliter son trafic intracellulaire et réguler sa distribution subcellulaire (J. Luo et al. 2019).

En dehors de son rôle au sein des structures membranaires, le cholestérol peut être métabolisé en divers oxystérols dont certains sont à l'origine des acides biliaires. De plus, l'oxydation du cholestérol au niveau de sa chaîne carbonée génère de la prégnénolone, le précurseur de toutes les hormones stéroïdes. Enfin, le cholestérol joue un rôle crucial dans la voie de signalisation Hedgehog en orientant le développement d'une variété de structures lors de l'embryogenèse animale (Porter, Young, et Beachy 1996).

Étant donné l'implication du cholestérol dans de nombreux contextes physiologiques, des perturbations de son homéostasie peuvent conduire à l'apparition de maladies congénitales chez l'homme (J. Luo, Yang, et Song 2020). De plus, un lien est clairement établi entre le métabolisme du cholestérol et le développement de pathologies acquises comme les maladies cardiovasculaires (MCV), l'Alzheimer et différents types de cancers (Shibuya, Chang, et Chang 2015; Silvente-Poirot et Poirot 2014).

2. Hypercholestérolémie

a. Généralités

L'hypercholestérolémie est définie comme une élévation du cholestérol associé aux LDL (LDLc) dépassant 190 mg/dL, 160 mg/dL si l'individu présente un facteur de risque et 130 mg/dL s'il en présente deux.

L'hypercholestérolémie est un des facteurs de risques majeurs au développement des MCV. D'autres facteurs peuvent entraîner ou favoriser leur émergence :

- L'âge et le sexe : homme > 45 ans et les femmes > 55 ans. Cette différence s'explique par le fait que les femmes seraient protégées avant la ménopause

grâce à l'œstrogène qui agit aussi comme un agent cardioprotecteur et immunomodulateur des réponses inflammatoires (Baker et al. 2003).

- Les antécédents familiaux
- L'hypertension
- Le diabète
- Le tabagisme
- Une faible concentration de cholestérol associé aux HDL (high density lipoprotein), des lipoprotéines de haute densité qui purgent les cellules du cholestérol qu'elles contiennent pour l'éliminer.

b. Facteurs génétiques

L'hypercholestérolémie familiale (FH) est une maladie d'origine génétique. C'est un trouble à transmission autosomale dominante, dû à la mutation du gène codant pour le récepteur aux LDL ou *LDLR* (low-density lipoprotein receptor) dans 85% des cas. Cela conduit à une concentration de LDLc supérieure à 190 mg/dL chez les hétérozygotes et à 450 mg/dL chez les homozygotes (OMS). En effet, on recense plus de 1600 mutations qui altèrent l'activité du récepteur ce qui empêche ou limite la clairance des LDL du sang conduisant ainsi à l'accumulation du LDLc et l'augmentation de la cholestérolémie (Sturm et al. 2018).

Notons qu'il existe d'autres altérations génétiques à l'origine d'une FH. Les mutations affectants l'*APOB*, l'apolipoprotéine présente sur les LDL et qui se lie au LDLR et les mutations gain de fonction sur le gène *PCSK9* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) induisant une dégradation accentuée du LDLR (Austin et al. 2004 ; Rader, Cohen, et Hobbs 2003). Les mutations du gène *LDLRAP1* (low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1), une protéine qui se fixe sur la partie endocellulaire du LDLR et favorise l'internalisation du couple LDLR-LDL, sont responsables d'une forme plus rare de FH à transmission autosomale récessive (Garcia et al. 2001).

En 2020, seuls 9% des pays avaient évalué la prévalence de la FH au sein de leur population (Beheshti et al. 2020). Grâce aux études qui y ont été menées on a pu l'estimer à 1/250 pour la forme hétérozygote et à 1/160 000-1 million pour la forme homozygote dans la population générale (Abul-Husn et al. 2016; Benn et al. 2012, 2016; Bucholz et al. 2018; Do et al. 2015; Gidding et al. 2015; Wald et al. 2016). Cependant, dans certaines populations comme les Canadiens-Français du Québec,

les Afrikanders (une population d'Afrique du Sud d'ascendance néerlandaise), les juifs ashkénazes et les chrétiens-libanais, la prévalence peut aller au-delà d'1/100. Les nobélisés Brown et Goldstein ont identifié, en 1987 au sein de la population des Canadiens-Français, que les mutations génétiques impliquées provoquaient une FH plus sévère que dans la population générale et que la fréquence de mutation du *LDLR* était largement associée à un « effet fondateur » causé par les ancêtres de la population actuelle (Hobbs et al. 1987). En 1604 s'est établi la première colonie française au Canada, Acadie. Au cours des XVII et XVIII siècles 20 000 français, majoritairement des hommes, ont émigré dans une seconde colonie, la Nouvelle France, l'actuelle ville de Québec (Choquette 1997). Pour pallier à ce déséquilibre de genre, augmenter la population coloniale et rivaliser avec les anglais, Louis XIV y envoie 800 femmes, les fameuses « filles du Roi » (Landry 1993). L'isolation géographique et culturelle, ainsi que les mariages hâtifs et le fort taux de natalité ont contribué à former une ethnie distincte au sein de laquelle la diversité génétique a été réduite avec le temps, favorisant l'endogamie et l'émergence de cet « effet fondateur » avec les conséquences physiopathologiques qu'il a encore aujourd'hui (Davignon et Roy 1993). Néanmoins, une étude menée sur une cohorte de cette population a permis récemment de développer une méthode de prédiction des événements cardiovasculaires chez les patients FH (Paquette, Dufour, et Baass 2017).

c. Facteurs environnementaux: historique et émergence

Au début du XXème siècle, après 10 000ans d'évolution et de différenciation, les agricultures étaient très diversifiées dans le monde. Les équipements et les niveaux de productivité étaient très inégaux et l'écart s'est davantage creusé au cours du XXème siècle où certaines agricultures ont été profondément transformées par une nouvelle révolution agricole concomitante à la deuxième révolution industrielle.

Amorcée aux Etats-Unis en début de siècle, cette **révolution agricole** s'est ensuite étendue dans les pays industrialisés développés. Le secteur agricole largement composés d'exploitations familiales a reçu le soutien de politiques de grande ampleur favorables à la modernisation de ces exploitations. L'industrie et la recherche développent des moyens mécaniques, chimiques et biologiques tels que la production de machines pour réduire la force de travail humaine et animale, l'utilisation d'engrais,

de produits phytosanitaires et la spécialisation des exploitations pour de meilleurs rendements. Par exemple, en céréaliculture, la superficie exploitée par travailleur a doublé à la fin du XXème siècle et les **rendements** ont été multipliés par dix. Dans certains pays en développement, majoritairement en Asie, une variante de la révolution agricole se met en place : la révolution verte. Dépourvue de grande motorisation-mécanisation, elle repose sur la sélection génétique des variétés à haut rendement comme le riz et le blé, sur l'utilisation d'engrais et de **pesticides** et la maîtrise de l'eau par irrigation ou drainage.

La production alimentaire mondiale a ainsi augmenté de façon spectaculaire et a été multipliée par 2,6 entre 1950 et 2000 ce qui a permis de nourrir une population globale qui dans le même temps a été multipliée par 2,4 passant de 2,5 milliards à 6 milliards de personnes. Les gains de productivité ont été si importants qu'ils ont souvent dépassé ceux des autres secteurs de l'économie et ont entraîné la chute des prix agricoles. De plus, avec la baisse des coûts de transports et la libéralisation des politiques agricoles et le développement du **commerce international**, les agriculteurs qui n'avaient pas adoptés cette révolution agricole ont subi la concurrence du marché. Les marchés internationaux ont été provisionnés par les pays développés, avec les Etats-Unis en tête, où la production agricole a progressé davantage que la population ce qui y a favorisé l'**enrichissement des régimes alimentaires** et l'**augmentation des exportations**. Cela a forcé les pays ayant adopté la révolution verte ainsi que les pays en développement à exporter davantage au détriment des populations locales trop souvent sous-alimentées. Ces inégalités d'équipement et de productivité dans les différentes agricultures du monde conduisent à creuser l'écart déjà existant et sont à l'origine de la pauvreté paysanne massive. La baisse des prix agricoles entraîne ainsi l'exode de millions de paysans, limite les investissements et décourage la production. C'est ainsi que dans les années 1990, les Etats-Unis et les gros producteurs européens ont délibérément limité leur production pour réduire la concurrence à l'international. Tout cela a concouru à freiner la croissance de l'offre alimentaire. D'un autre côté, la demande alimentaire est en constante augmentation du fait de la **croissance de la population**, l'augmentation des revenus et l'**urbanisation**. Ces phénomènes ont d'ailleurs concourus pour certains à un enrichissement des régimes alimentaires en **viandes** et en **produits laitiers**, des produits riches en **cholestérol** (Anseeuw et al. 2012; Mazoyer et Roudart).

En effet, si la production alimentaire a évolué au fil du temps, le type de production et le régime alimentaire ont eux aussi été perturbés. En remontant au XIX^{ème} siècle on peut souligner deux phénomènes alimentaires dont la survenue va avoir un impact majeur sur la santé des contemporains. En 1812, la découverte du processus d'extraction du **sucre** de betterave va permettre d'introduire progressivement le sucre dans l'alimentation de l'ensemble de la population alors qu'il était jusque-là un produit marginal car très cher. Si au début du siècle la consommation de sucre est de 0,8kg par an, elle passe à 40kg en 1960. Aussi, la découverte en 1870 du moulin à cylindre, permet de rendre accessible à toute la population la véritable **farine blanche** que l'homme égyptien déjà cherchait à raffiner. Cependant, la farine en ressort drastiquement appauvrie sur le plan nutritionnel avec une **perte de protéines**, de **fibres** et d'acides gras au profit d'un produit quasi composé d'amidon. Avec le temps, on observe une restructuration du régime alimentaire, notamment en France entre 1880 et 1980 où la part calorique d'origine glucidique passe de 70 à 45% de l'apport énergétique total et la **part lipidique** qui monte de 16% à 42% (FAO). Aujourd'hui, l'industrialisation alimentaire est considérable et les productions de denrées traditionnelles (huile, farine, beurre, fromage, confiture, ...) sont désormais réalisées par des usines importantes qui ont pu se sortir des nombreuses crises. L'évolution des mœurs et de la société caractérisées par l'émancipation féminine et la pression du « travailler plus pour gagner plus » au sein d'entreprises qui facilitent (en façade) les conditions de travail de leurs employés, participent au développement de l'industrie du « prêt à manger », à la **surconsommation** et à la **sédentarité**. De plus, le développement des transports et du commerce mondial, en dehors de faire augmenter la **pollution** mondiale, donne accès à une variété de produits exotiques et de désaisonnaliser les productions. Enfin, les Etats-Unis qui sortent grands gagnants des révolutions agricoles et industrielles, sont à l'origine de la mondialisation de leur mode alimentaire essentiellement issue de **produits manufacturés riches en graisse et en sucre et pauvres en fibres**. En dehors de leur pauvreté nutritionnelle, le sucre, la farine blanche et la pomme de terre qui émerge à la même époque, ainsi que les régimes type « fast Food » sont autant d'aliments qui entraînent des **effets pervers sur le métabolisme** et qui sont des facteurs de risques majeurs de l'obésité, du diabète et des **maladies cardiovasculaires** (Montanari et Flandrin 1996).

C'est ainsi que l'épidémiologiste Remy Slama nous aide à conclure : « On peut dire schématiquement que l'Anthropocène, qu'on peut faire débuter avec la révolution industrielle à la fin du XVIIIe siècle en Europe, marque une rupture. Avant le XIXe siècle, la majorité des causes de décès étaient liées aux agents infectieux et aux famines. Avec la révolution industrielle, nos sociétés d'Europe ont connu une transition épidémiologique par laquelle nous sommes parvenus à contrôler fortement les maladies infectieuses. L'espérance de vie s'est accrue, et les principales causes de décès sont devenues les maladies chroniques, comme les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives ou les cancers. La recherche en **santé environnementale** s'intéresse aux causes plus lointaines de ces maladies, les causes des causes de décès, en quelque sorte. Elles prennent la forme de facteurs physiques, chimiques, comportementaux, sociaux et, encore à ce jour, infectieux, bien que ces derniers ne représentent plus la contribution principale. Tout cela forme l'**exposome**, une notion à laquelle réfléchissent les scientifiques depuis une quinzaine d'années. Il désigne l'ensemble des expositions environnementales que l'on subit depuis la conception jusqu'à la fin de la vie. »

d. Préventions et thérapeutiques

La concentration optimale de LDLc est inférieure à 100 mg/dL. Prévenir l'hypercholestérolémie, c'est avoir un mode de vie sain, un poids optimal, ne pas fumer, avoir une activité physique régulière et une alimentation faible en acides gras saturés et enrichie en fibres, fruits, légumes et poisson.

Chez les patients atteints d'hypercholestérolémie, les statines, des inhibiteurs de la synthèse du cholestérol, aident à réduire le LDLc de 22% à 50% en fonction de la classe moléculaire choisie. En France, 5 médicaments référents et plus de 50 génériques sont disponibles sur le marché (VIDAL). D'après une étude pharmaceutique menée dans 83 pays, on estime qu'en 2018, près de 150 millions de personnes prennent des statines ce qui en fait l'hypocholestérolémiant le plus prescrit au monde (Blais et al. 2021). Cependant des effets secondaires graves peuvent surgir. Parmi eux on retrouve une élévation du taux de transaminases (qui poussent à réduire la prise de statines) et des affections musculaires (qui peuvent conduire à des insuffisances rénales). Lorsque le LDLc n'est pas contrôlé avec la seule prise de statines, des médicaments additionnels sont nécessaires, notamment l'ezetimibe, un

inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol. Actuellement, les patients FH homozygotes, chez qui les concentrations de LDLc restent élevées, sont traités par aphérèse. C'est une méthode au cours de laquelle le sang est purgé sélectivement de ses LDL et qui est réalisée toutes les 2 semaines. Par ailleurs, une nouvelle thérapie a été développée et dont l'utilisation a été validée pour les patients FH, qui consiste à combiner les statines avec des anticorps monoclonaux de la protéine PCSK9. La colestyramine, une résine qui piège les acides biliaires dans l'intestin et empêche leur réabsorption, peut aussi être prescrite pour diminuer le LDLc. Un contrôle partiel de l'hypercholestérolémie pourrait être atteint par l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour induire la synthèse d'APOB100 ou d'ezetimibe ou bien d'inhiber la MTP (microsomal triglyceride transfer protein), une protéine impliquée dans l'assemblage de lipoprotéines chargées en cholestérol (Ibrahim, Asuka, et Jialal 2021; VIDAL).

Tout récemment, des chercheurs ont utilisé la technologie de CRISPR Cas9 sur des macaques pour cibler le gène *PCSK9* afin de l'inactiver. Après une simple injection, l'expression du gène a été quasi éteinte dans le foie, le LDLc a été réduit de 60% et ces modifications restent stables dans le temps. Cette technique, si elle est validée et utilisée chez l'homme, aurait l'avantage de ne nécessiter qu'une simple injection alors que les anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9 requièrent de multiples injections (Musunuru et al. 2021).

Enfin, la réduction drastique du LDLc est observée à la suite d'une transplantation de foie, témoignant du rôle majeur des récepteurs hépatiques dans la régulation du LDLc. Toutefois, la greffe de foie demeure une opération lourde et rare et qui est plutôt indiquée au cours d'un cancer ou d'une cirrhose alcoolique.

II. Évolutions physiopathologiques de l'athérosclérose

Les MCV représentent la première cause de mortalité au monde. On estime à 17,7 millions le nombre de décès causés par les MCV, soit 31% de la mortalité mondiale totale. En 2015, 7,4 millions de personnes sont mortes d'une cardiopathie coronarienne et 6,7 millions d'un AVC. La plupart des décès liés aux MCV

interviennent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire. Cela est dû au mode de vie inadapté et au manque de médicalisation. En effet, la prévention et la prise en charge des patients sont essentielles pour réguler les facteurs de risques comme l'hypercholestérolémie. Car lorsqu'elle n'est pas contrôlée, elle conduit au développement de l'athérosclérose, une pathologie des artères, qui est la cause la plus courante des MCV (OMS).

1. Généralités

A l'origine de l'athérosclérose, on distingue les facteurs de risques non modifiables tels que des prédispositions génétiques, l'âge et le sexe et les facteurs modifiables comme l'hypercholestérolémie, le tabagisme, le surpoids, le diabète, la sédentarité, le stress, l'alcool et une alimentation trop riche, qui sont responsables de 90% des complications cardiovasculaires. Cependant, une étude menée sur des momies datant de l'ère prémoderne, et issues de 4 régions géographiquement distinctes, a mis en évidence la présence d'athérosclérose dans les vaisseaux de 34% d'entre elles. Cela suppose que l'homme a une prédisposition pour cette maladie indépendamment du contexte, de l' « exposome », dans lequel il évolue (Thompson et al. 2013).

Telle que définie en 1957 par le Groupe d'étude de l'OMS, l'athérosclérose est « une association variable de remaniements de l'intima des artères (en tant que distinctes des artérioles) consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts de calcium, le tout accompagné de modifications de la media » (OMS 1957).

L'athérosclérose tient son nom de l'association d'athérome et de sclérose dans la paroi artérielle. L'athérome, du grec « *athéré* » qui signifie « bouillie », représente la partie molle au centre, riche en lipides, appelée « cœur lipidique ». La sclérose, du grec « *skléros* » qui signifie « dur », représente la partie fibreuse qui recouvre le cœur lipidique du côté de la lumière artérielle et forme la « chape fibreuse » (*Figure 3*).

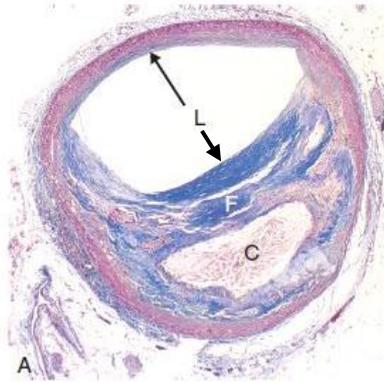


Figure 3 : Photographie d'une plaque d'athérosclérose humaine après colorations

(L : lumière du vaisseau ; F : chape fibreuse ; C : cœur lipidique)

Depuis 1957, sa définition a évolué et l'athérosclérose est considérée comme une maladie lente, progressive et à composante inflammatoire. L'apparition des premiers signes se fait dès le plus jeune âge et les différents stades de progression de la maladie ont été classifiés. La lésion décrite par l'OMS correspond à la lésion de type V (Table 1).

Type de lésion		Appellation	Description	Age d'apparition
p r é c o c e	I	Macrophages spumeux isolés	Macrophages spumeux isolés dans l'intima	0-15
	II	Strie lipidique	Couches de macrophages spumeux parsemés de cellules musculaires lissées chargées de lipides au sein de l'intima	0-15
	III	Pré-athérome	Lésion de type II modifiée par une accumulation de dépôts lipidiques extracellulaires formant des agrégats	15-35
a v a n c é e	IV	Athérome	Lésion de type III aggravée par une accentuation des dépôts lipidiques formant un noyau	15-35
	V	Plaque d'athérosclérose	Lésion de type IV modifiée par un dépôt massif de fibres de collagène, parfois calcifié entourant le cœur lipidique	30-40
	VI	Plaque d'athérosclérose compliquée	Type IVa, érosion de l'endothélium de la plaque générant un thrombus Type IVb, hémorragie intra-plaque Type IVc, plaque rompue générant un thrombus	30-40

Table 1 : Classification des lésions d'athérosclérose
(D'après Stary et al. 1995)

2. Les macrophages : des acteurs clés de l'inflammation

Les macrophages sont des phagocytes du système immunitaire inné qui participent à la première ligne de défense contre les pathogènes et les lésions tissulaires. Initialement décrites par Elie Metchnikoff en 1883, il les nomme du grec « macro » « gros », et « phage » « manger » en relation avec leur fonction. Ils jouent un rôle essentiel au sein des tissus en condition d'homéostasie et sont des acteurs clés de l'inflammation.

L'athérosclérose étant une maladie à forte composante inflammatoire et ma thèse portant sur une population de macrophages en particulier, je propose donc ci-dessous une présentation de ces cellules, exposant leurs origines, leur hétérogénéité et leurs fonctions.

a. le système immunitaire

i. Origine du système immunitaire

A partir de la naissance, les cellules du sang proviennent toutes de la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques (CSHs) pluripotentes sont continuellement à l'origine de progéniteurs des cellules du sang et parviennent à se maintenir dans la moelle par prolifération. Les études sur les cellules souches découlent d'observations menées sur les victimes des bombardements à Hiroshima et Nagasaki. En effet, une seconde vague de mortalité est survenue dans les semaines qui ont suivi les bombardements sur des personnes qui n'étaient pas mortes à cause de brûlures ou de blessures dues à l'explosion même. Le corps médical a observé une perte de pilosité et un taux de cellules dans le sang extrêmement bas, ce qui les a poussés à conclure que la mortalité était due au non renouvellement des cellules sanguines dont les précurseurs auraient été détruits par l'irradiation. Ces observations ont été vérifiées chez la souris par James Till et Ernest MacCulloch au début des années 60s (Steensma et Kyle 2021). De nombreux autres travaux ont été nécessaires pour caractériser l'origine de ces progéniteurs. Il est aujourd'hui admis que les CSHs présentes dans la moelle osseuse adulte ont été générées au cours de l'embryogénèse (Cumano, Dieterlen-Lievre, et Godin 1996).

L'hématopoïèse est le processus au cours duquel les CSH prolifèrent et se différencient en n'importe quelle cellule du sang. On distingue les globules rouges des globules blancs qui constituent le système immunitaire.

ii. Diversités des systèmes

Le système immunitaire est un réseau de cellules et d'organes par lequel le corps se défend contre les invasions extérieures (virus, bactérie) mais aussi les lésions tissulaires dans les désordres internes comme le cancer. Ce système est composé de cellules qui attaquent les pathogènes et cellules infectées et de molécules sécrétées qui modulent l'action de cellules (cytokines) ou qui se lient directement aux pathogènes pour faciliter leur élimination (complément et anticorps). Dans le but de protéger le corps de façon efficace, le système immunitaire doit distinguer les menaces des éléments inoffensifs : il apprend à tolérer les éléments extérieurs bénéfiques comme les nutriments et à reconnaître les dangers potentiels.

Le système immunitaire peut être divisé en deux lignes de défenses fondamentales : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée, avec les barrières structurelles comme la peau et les muqueuses, représente la première ligne de défense contre les pathogènes. Elle est orchestrée par des cellules spécialisées, comme les monocytes et les macrophages, qui initient une réponse rapide dans les minutes ou les heures qui suivent l'agression. L'immunité adaptative consiste quant à elle à développer une réponse spécifique à un antigène rencontré. Elle se met en place plus tardivement mais possède une capacité de mémoire à long terme, via les lymphocytes T et B, qui permet à l'hôte d'induire une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une prochaine exposition à l'antigène. A l'interface de ces deux systèmes, on retrouve les phagocytes du système immunitaire innée, les macrophages et les cellules dendritiques (DCs). Ils « engloutissent » et dégradent les pathogènes ou les cellules mortes et jouent le rôle de présentateurs d'antigène afin d'activer le système adaptatif (*Figure 4*).

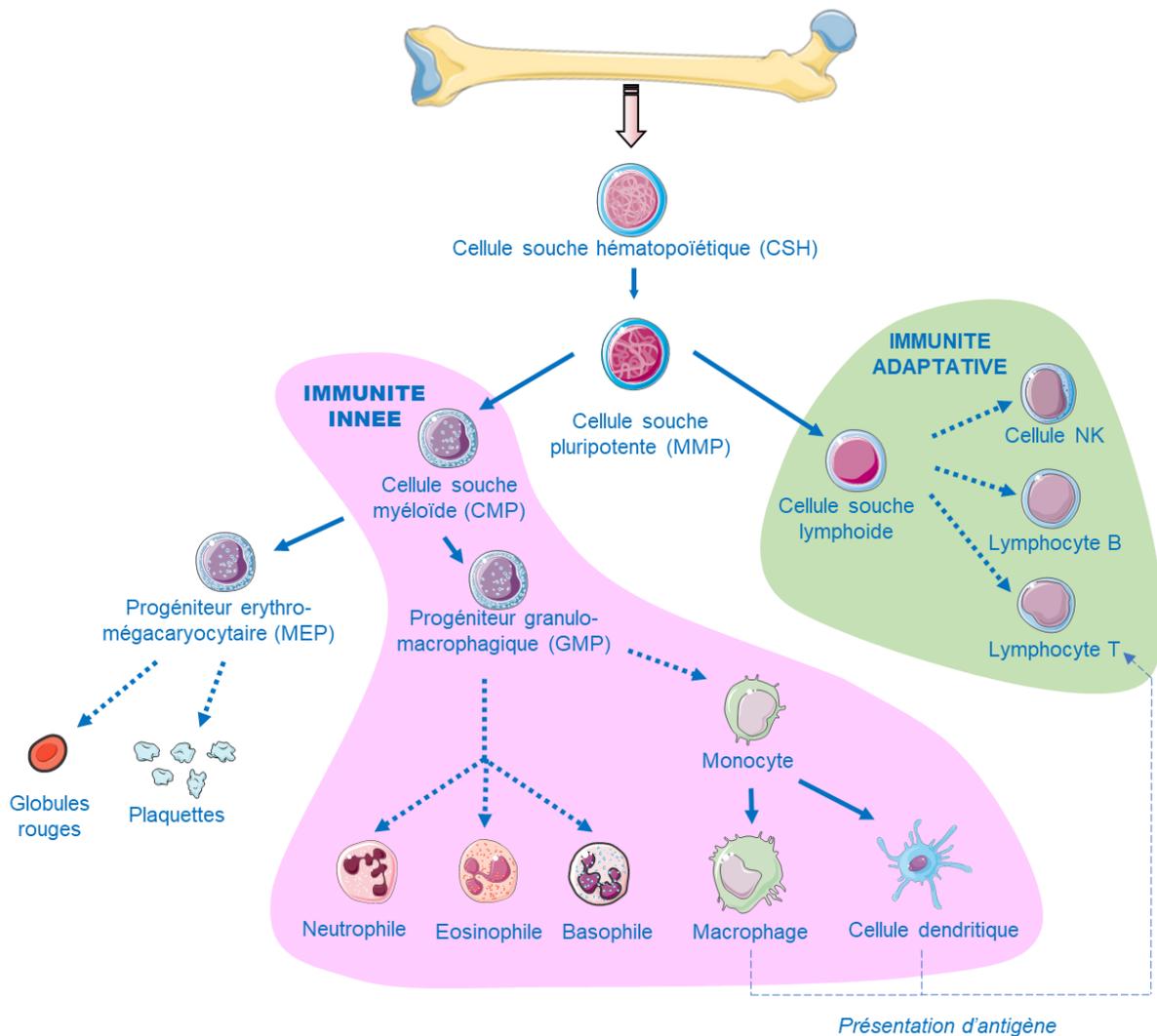


Figure 4 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse adulte dans la moelle osseuse

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai particulièrement étudié le rôle des macrophages dans un contexte d'hypercholestérolémie, c'est pourquoi la suite du propos va se focaliser sur ces cellules et les monocytes dont elles dérivent.

b. Monocytes

i. Hétérogénéité

Les monocytes sont une population de leucocytes conservée chez tous les vertébrés. Ils sont définis par leur localisation, leur phénotype, leur morphologie ainsi que par leur signatures géniques (Cros et al. 2010; Etzrodt et al. 2012; Ingersoll et al. 2010; Mildner

et al. 2013). Ils représentent 4% des cellules nucléées sanguines chez la souris et 10% chez l'homme et leur hétérogénéité a pu être mise en évidence par des approches de cytométrie en flux.

Chez l'homme, on distingue 3 populations caractérisées par l'expression des marqueurs CD14 et CD16. Les monocytes classiques CD14⁺CD16⁺, les monocytes intermédiaires CD14⁺CD16⁻ et les monocytes non-classiques CD14⁻CD16⁺ (Passlick, Flieger, et Ziegler-Heitbrock 1989). Chez la souris, les monocytes expriment le CD115 (ou CSF1R) et on distingue deux sous populations de monocytes. Les monocytes classiques LY6C⁺CX3CR1^{mid}CCR2⁺ et les monocytes non-classiques LY6C⁻CX3CR1⁺CCR2⁻ (Geissmann et al. 2005; Palframan et al. 2001).

Les profils d'expression comparés des populations humaines et de souris permettent de rapprocher les monocytes classiques et les non-classiques entre les deux espèces. Néanmoins, des différences subsistent notamment concernant l'expression des gènes impliqués dans la fonction de phagocytose, mais aussi dans la représentation des sous populations dans le sang. Si chez l'homme, les monocytes classiques représentent 90% du pool total, chez la souris, les sous-population contribuent à hauteur égale à la constitution du pool.

ii. Développement

Les monocytes proviennent de précurseurs myéloïdes au cours de l'embryogenèse et de l'hématopoïèse adulte. Un modèle de différenciation propose que, dans la moelle osseuse, les progéniteurs de granulocytes et de macrophages ou GMPs (granulocyte-monocyte progenitors) se différencient en précurseurs des macrophages et des cellules dendritiques ou MDPs (monocyte and dendritic cell progenitor) (Fogg et al. 2006). Plus récemment il a été montré que ces derniers dérivent d'un progéniteur commun des monocytes ou cMoP (monocyte-committed progenitors) qui est à l'origine des monocytes Ly6C⁺ et Ly6C⁻ (Hettinger et al. 2013).

Le développement et la survie des monocytes dépendent en grande partie du facteur de croissance CSF1 (colony stimulating factor 1) et la déficience pour son récepteur CSF1R entraîne une monocytopenie sévère chez la souris (Cecchini et al. 1994; Dai et al. 2002).

D'autres facteurs sont impliqués notamment C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta) et NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1) essentiels pour la survie des monocytes LY6C $^-$, alors que le développement des monocytes LY6C $^+$ repose sur KLF4 (Kruppel-like factor 4) (Terry et Miller 2014). Une fois générés dans la moelle osseuse, les monocytes LY6C $^+$ rejoignent la circulation sanguine grâce à l'expression du CCR2 et peuvent être mobilisés dans les tissus. Les monocytes LY6C $^+$ peuvent aussi se convertir en monocytes LY6C $^-$ par l'induction du facteur C/EBP β ou à travers la production endothéliale de DLL1 qui va agir sur la voie Notch et promouvoir la conversion des monocytes. Les monocytes LY6C $^-$ vont ensuite demeurer dans les vaisseaux (Gamrekelashvili et al. 2016; Yona et al. 2013).

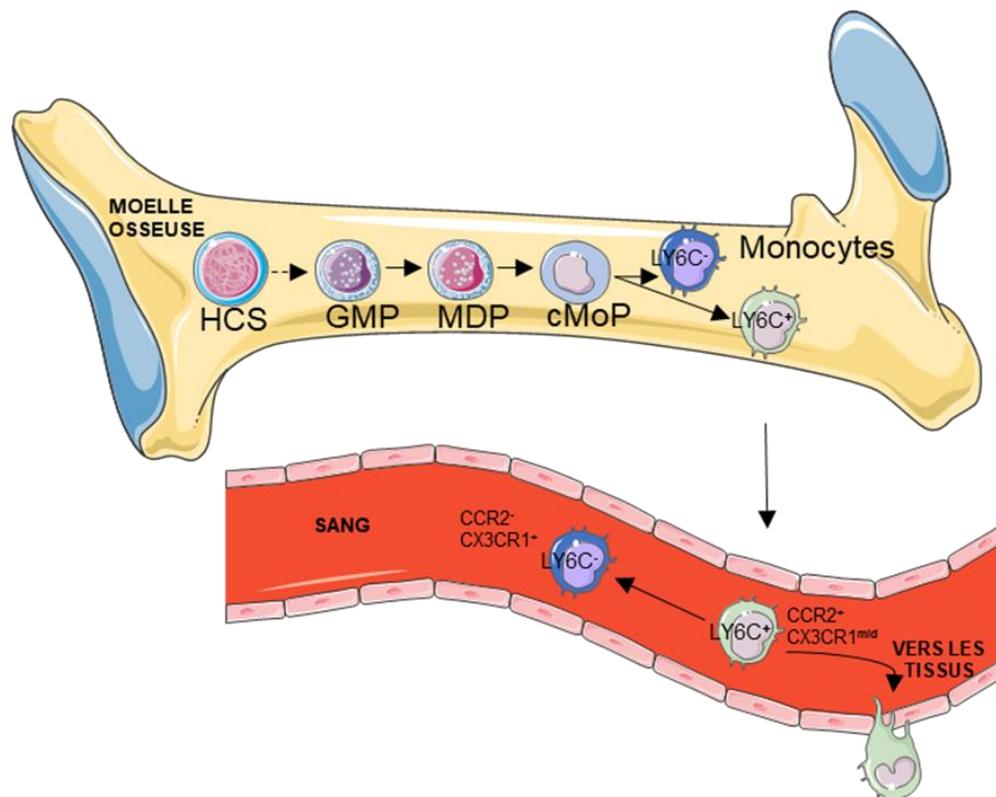


Figure 5 : Développement des monocytes chez la souris

(D'après Ginhoux et Jung 2014)

Bien que la moelle osseuse constitue l'organe de référence pour la génération de monocytes adultes, la rate, en tant qu'organe lymphoïde secondaire sert de réservoir important pour les monocytes (Hettinger et al. 2013). Cette hématopoïèse extramédullaire est toutefois activée lors d'épisodes inflammatoires (Swirski et al. 2009) comme l'ischémie ou l'athérosclérose (Robbins et al. 2013).

iii. *Monocytes non-classiques*

- Homéostasie

Les monocytes non-classiques ont une durée de vie de 2 à 7 jours chez la souris contrairement aux monocytes classiques qui vivent environ 1 jour (Patel et al. 2017; Yona et al. 2013).

Les études de microscopie intravitale permettent de mieux comprendre la fonction des monocytes LY6C⁻. En condition physiologique, ces monocytes sont présents en continu dans les vaisseaux et roulent sur les cellules endothéliales selon un mécanisme induisant la reconnaissance entre l'intégrine LFA-1 à la surface des monocytes et la protéine de surface ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) au niveau endothélial (Auffray et al. 2007). Ce rôle de patrouilleur est observé dans les capillaires, les artérioles et les veines. Les monocytes Ly6C⁻ sont capables d'éliminer les microparticules présentes dans la lumière des vaisseaux et jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité cellulaire endothéliale. Enfin, on observe un comportement similaire des monocytes non-classiques humains une fois transférés chez la souris (Cros et al. 2010, 14).

- Pathologie

La fonction des monocytes non-classiques au cours de l'inflammation n'est aujourd'hui pas clairement établie. Il a toutefois été proposé qu'ils puissent, sous certaines conditions, infiltrer les tissus lésés (Arnold et al. 2007) bien qu'on puisse penser que les monocytes détectés ne soient la résultante de la perte du LY6C par les monocytes classiques avant qu'ils ne se différencient en macrophages (Arnold et al. 2007; Avraham-Davidi et al. 2013; Zigmond et al. 2012).

D'autre part, des études ont montré que les monocytes LY6C⁻ coordonnaient des réponses au stress dans les vaisseaux. Ils détectent les dangers grâce au récepteur TLR7 (toll-like receptor 7) et permettent le recrutement de neutrophiles qui induisent la nécrose des cellules endothéliales endommagées. Le monocyte élimine ensuite les débris cellulaires (Auffray et al. 2007).

iv. Monocytes classiques

- Homéostasie

Les monocytes classiques sont une population de cellules transitoires dont le potentiel de différenciation est assez large. Contrairement aux monocytes non-classiques, leur profil d'expression génique, notamment mené par *Ccr2*, leur permet de migrer au sein des tissus. Dans des conditions homéostatiques, la sortie du monocyte depuis la moelle osseuse est contrôlée par le gène circadien *Bmal1* (basic helix-loop-helix ARNT like 1) qui permet des vagues de mobilisation diurnes de la moelle vers les vaisseaux. Ensuite, le monocyte ne reste dans le compartiment vasculaire qu'un seul jour avant d'infiltrer les tissus pour repeupler la population de macrophages qui y réside. C'est le cas pour l'intestin, la peau, le cœur, le pancréas, les poumons et les testicules. Il peut aussi maintenir son statut de monocyte au sein du tissu sans activer de différenciation et constituer un réservoir local de monocytes (Swirski et al. 2009). De façon alternative, il peut rester dans le compartiment luminal et se différencier en monocytes non-classiques.

- Pathologie

Au cours de l'inflammation, un recrutement rapide de cellules myéloïdes, et notamment de monocytes ou monopoïèse, est observé sur le site de la lésion. Cela est possible grâce à l'hématopoïèse continue dans la moelle osseuse, mais il arrive que certaines cellules échappent au développement classique et que des monocytes dérivent de précurseurs en amont (Yáñez et al. 2017). Si aujourd'hui on ne dispose pas de marqueurs de surface permettant de les distinguer clairement, on peut imaginer qu'il existe une variété de monocytes infiltrés sur les sites lésés. L'urgence de la situation n'induit pas seulement une augmentation du nombre de monocytes mais affecte aussi leur fonction. Ils vont développer une activité pro et anti-inflammatoire qui favorise la présentation d'antigènes ou le remodelage tissulaire, se différencier en macrophage et influencer ainsi le développement de diverses pathologies.

La fonction et l'importance des monocytes pro-inflammatoires a été bien documentée dans les maladies auto-immunes et particulièrement dans les modèles murins de scléroses ou EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) (Fife et al. 2000; Izikson et al. 2002) et de colite ulcéreuse (Platt et al. 2010) au cours desquelles les

monocytes LY6C⁺ sont mobilisés depuis la circulation au sein du tissu inflammé. La souris déficiente pour le gène *Ccr2*, dépourvue de monocytes LY6C⁺, est résistante à l'induction de ces pathologies suggérant que ces monocytes favorisent leur développement (Ajami et al. 2011; King, Dickendesh, et Segal 2009; Mildner et al. 2013).

Les TipDCs (TNF/iNOS-producing dendritic cells) sont une population dérivée des monocytes LY6C⁺ capable de produire du TNF (tumor necrosis factor) et du NO (nitric oxide). Elles ont initialement été décrites au cours d'infection à la *Listeria* (Serbina et al. 2003) mais aussi à d'autres bactéries (Bosschaerts et al. 2010; Guilliams et al. 2009; Serbina et al. 2003). Classifiées en tant que DCs car elles contribuent, à moindre mesure, à l'activation de LT CD4⁺, cette nomination est erronée depuis qu'il a été montré que l'infection était augmentée chez la souris dépourvue de monocytes recrutés (De Trez et al. 2009; Dunay et al. 2008; Serbina et al. 2003). Si dans un premier temps, ces cellules aident les macrophages du tissu à combattre l'infection, une accumulation prolongée au cours d'infections chroniques entraîne des dommages collatéraux dans le tissu (Guilliams et al. 2009). C'est d'ailleurs le cas au cours de l'athérosclérose où les monocytes recrutés prolifèrent au sein du tissu et secrètent des chimiokines qui favorisent le recrutement d'autres monocytes et contribuent ainsi à l'exacerbation de la lésion (Tacke et al. 2007).

Les monocytes participent aussi à la phase de résolution de l'inflammation dont l'objectif est de rétablir une homéostasie tissulaire. La fonction de phagocytose du monocyte permet d'éliminer les débris cellulaires, d'induire le catabolisme des cytokines et de sécréter des médiateurs régulateurs (Newson et al. 2014). Cette fonction a été montrée dans un modèle de résolution d'infarctus du myocarde, au cours duquel les monocytes classiques induisent une angiogenèse réparatrice du tissu par l'expression du facteur de croissance vasculaire VEGF (vascular endothelial growth factor) (Nahrendorf et al. 2007). Aussi, lors d'une fibrose hépatique induite, les monocytes recrutés sont responsables de la résolution du dommage tissulaire en dégradant la matrice extra cellulaire (MEC) et éliminant les débris cellulaires (Nahrendorf et al. 2007). Enfin, le rôle des monocytes dans le microenvironnement tumoral est multiple et traverse les différentes phases de développement du cancer, depuis l'initiation et l'angiogenèse associée jusqu'à l'échappement immunitaire et les métastases (Bronte et al. 2016).

Ainsi, l'ensemble de ces exemples souligne le rôle essentiel des monocytes en conditions physiologique et pathologique (Figure 6).

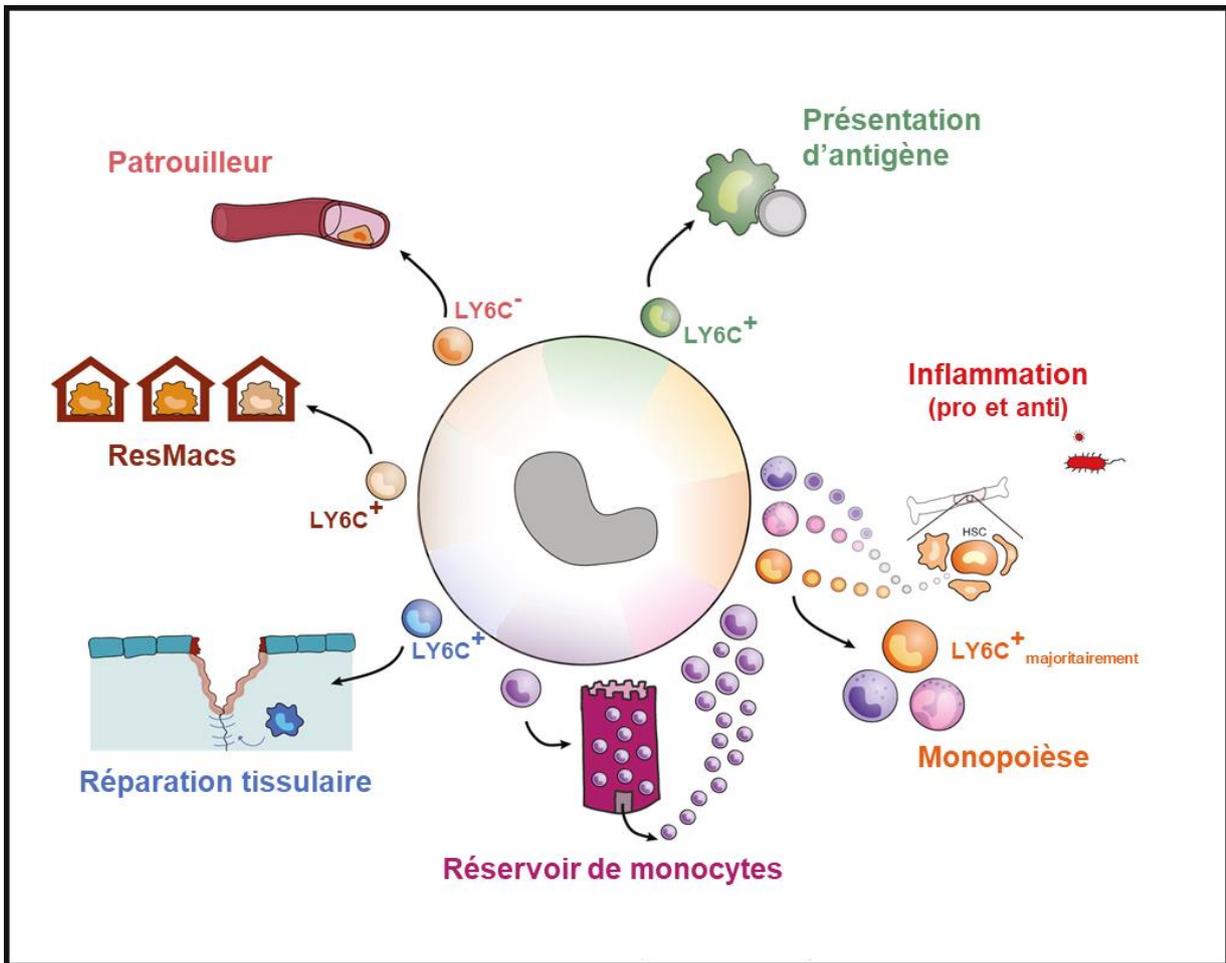


Figure 6 : Diversités des fonctions des monocytes en conditions physiologique et pathologique

(Adapté de Williams, Mildner, et Yona 2018)

c. Macrophages

i. Développement

Les macrophages sont présents dans tous les tissus chez les mammifères et leur ontogénie est multiple. Dans l'embryon, ils peuvent se développer avec et au sein des différents tissus qu'ils peuplent, ce sont les macrophages résidents (ResMacs). Chez l'adulte, ils sont recrutés dans le tissu suite à un stimulus, ce sont les macrophages dérivés des monocytes (ou MoDMacs).

Lors de l'embryogenèse, il existe plusieurs vagues hématopoïétiques au cours desquelles les ResMacs se développent. La vague primitive donne naissance aux ResMacs du cerveau à partir du précurseur érythro-myéloïde ou EMP (Erythro-Myeloid Progenitor) dans le sac vitellin (Gomez Perdiguero et al. 2015). Dans un second temps, lorsque la circulation sanguine est établie au sein de l'embryon, ce précurseur EMP gagne le foie fœtal où il se différencie en monocytes qui seront à l'origine des ResMacs périphériques qui peuplent les différents tissus (Li et al. 2014). Enfin, une troisième vague débute au niveau de la région AGM (aorte-gonades-mésonephros) dans laquelle un précurseur CSH est généré, véhiculé jusqu'au foie fœtal puis vers la moelle osseuse où il établit résidence (Hoeffel et al. 2015). Il sera à l'origine de l'hématopoïèse adulte et de la génération de toutes les cellules du sang et notamment des monocytes qui pourront dériver en MoDMacs (Sheng, Ruedl, et Karjalainen 2015).

Une des grandes différences entre ces progéniteurs, c'est que si la CSH a des propriétés d'auto-renouvellement, l'EMP est transitoire et donne naissance à des macrophages qui gagnent cette capacité au sein du tissu (*Figure 7*).

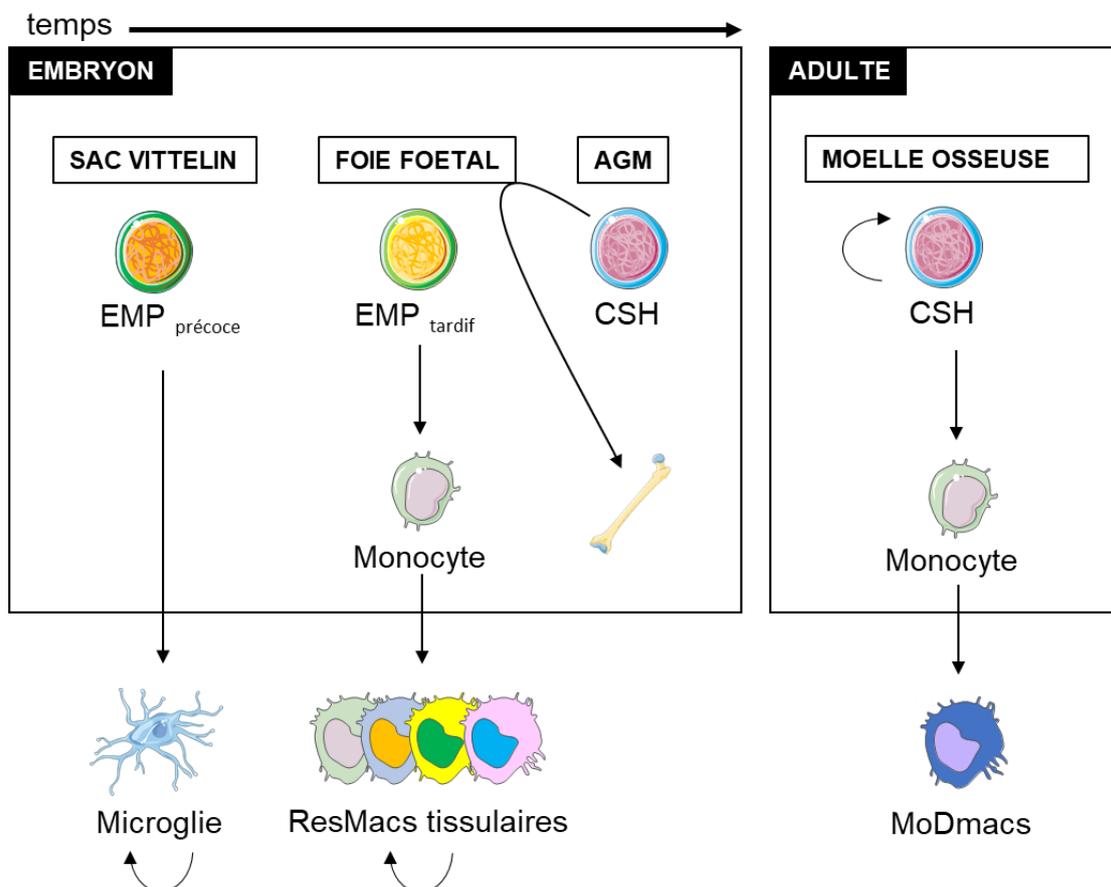


Figure 7 : Lignées d'établissement de macrophages chez l'embryon et l'adulte

ii. *Hétérogénéité des macrophages résidents d'origine embryonnaire*

En dehors de leurs fonctions de sentinelle et de phagocytes partagés par tous les macrophages, les différences phénotypiques et leurs spécialisations fonctionnelles expliquent leur hétérogénéité (Epelman et al. 2014; Epelman, Lavine, et Randolph 2014; Gordon et Taylor 2005; Haldar et Murphy 2014). Elle est le résultat de combinaisons de signaux reçus lors de leur genèse qui orientent leur identité (Davies et al. 2013; Gautier et al. 2012).

Ainsi, il est établi que les macrophages sont fortement adaptés à leur tissu de résidence et réalisent des fonctions spécifiques essentielles à l'homéostasie de l'organe. Par exemple, dans le tissu osseux, les ostéoclastes sont hautement spécialisés dans la résorption de l'os (Boyle, Simonet, et Lacey 2003). Dans le cerveau, la microglie participe notamment au développement du cerveau et à sa protection (Parkhurst et al. 2013; Schafer et al. 2012). Au niveau de la rate, les macrophages de la pulpe rouge sont impliqués dans l'homéostasie des globules rouges et du fer (Kohyama et al. 2009). Ceux de la zone marginale participent à la capture d'antigènes circulants (Aichele et al. 2003). Essentiels dans les poumons constamment exposés aux pathogènes contenus dans l'air (irritants, microbes), les macrophages alvéolaires permettent de recycler le surfactant (Hussell et Bell 2014; Thomas et al. 1976). Dans l'intestin, plusieurs populations de macrophages coexistent, certains en profondeur assurent le péristaltisme, en cohésion avec les cellules musculaires et les neurones, d'autres au niveau de l'endothélium ont un rôle de surveillance et de maintien de l'intégrité du tissu (Muller et al. 2014). Enfin, les macrophages résidents du foie, les cellules de Kupffer (KCs) assurent la clairance des éléments du sang en provenance de l'intestin et participeraient à l'homéostasie du fer (Eckert et al. 2015).

Ces KCs, qui font l'objet de mes travaux de thèse, serviront d'exemple dans une autre partie pour détailler davantage les acteurs impliqués dans la génération des macrophages résidents ainsi que leur maintien dans le tissu.

iii. *Hétérogénéité des macrophages dérivés des monocytes*

- *Établissement en macrophages résidents*

En condition physiologique, dans certains tissus comme le cerveau, le foie, l'épiderme, le poumon, le pancréas et la pulpe rouge de la rate, les ResMacs se maintiennent par auto-renouvellement avec une contribution minime des monocytes circulants (Gomez Perdiguero et al. 2015; Hashimoto et al. 2013; Yona et al. 2013).

Cependant, dans l'intestin, le cœur et le péritoine, on distingue des populations de macrophages de différentes origines dans le tissu adulte. Certaines datent de l'embryogenèse, d'autres dérivent de monocytes (Calum C. Bain et Mowat 2014; Molawi et al. 2014; Shaw et al. 2018). Ces derniers permettent le renouvellement des populations d'origine embryonnaire dans des proportions variables entre les tissus.

En conditions pathologiques, des monocytes peuvent être recrutés dans les tissus et se différencier en macrophages qui acquièrent des caractéristiques assez proches des ResMacs du tissu infiltré. Cela a été observé dans le péritoine (Yona et al. 2013), le poumon (Machiels et al. 2017) et le foie (Blériot et al. 2015; Bonnardel et al. 2019; Lai et al. 2018; Scott et al. 2016, 2018; Tran et al. 2020).

Bien qu'il existe des marqueurs permettant de distinguer les macrophages d'origine embryonnaire ou monocyttaire au sein des tissus, des analyses transcriptomiques ont montré qu'ils partageaient 90% de leur transcriptome (Beattie et al. 2016; Gibbings et al. 2015; van de Laar et al. 2016; Lavin et al. 2014; Scott et al. 2016). Cela suggère que l'environnement ou niche, participe à l'identité du macrophage (Guilliams et Scott 2017). L'étude de ces populations de ResMacs dans le foie dans un contexte d'hypercholestérolémie constitue une grande partie de mes travaux de thèse. Leurs similitudes ainsi que leurs différences feront l'objet d'un paragraphe dans les parties suivantes.

- *Macrophages transitoires*

L'inflammation est la réaction initiale à la lésion ou l'infection d'un tissu. Localement, les cellules immunitaires, ainsi que les cellules qui servent de barrières (épithélium) vont détecter, grâce à l'expression de récepteurs à leur surface ou PRRs (pattern recognition receptor), des signaux de dangers tels que les marqueurs de dommages tissulaires ou DAMPs (damage associated molecular pattern) et les marqueurs de

molécules pathogènes ou PAMPs (pathogen associated molecular patterns) (Takeuchi et Akira 2010). Cela induit une cascade de réactions qui va mener à la production de cytokines et de chimiokines, notamment par l'activation de la voie NF κ B (H. Guo, Callaway, et Ting 2015). Les cytokines et chimiokines contribuent aux recrutements d'autres cellules immunitaires, comme les monocytes, notamment en modifiant la perméabilité de l'endothélium (Marcus et al. 1996; Skaria et al. 2016). Une fois dans le tissu, en dehors d'exercer leurs fonctions propres, les monocytes vont pouvoir se différencier en MoDMacs. Ces macrophages ont souvent un phénotype pro-inflammatoire et sécrètent des médiateurs comme le TNF, l'interleukine 1 β (IL1 β) et le NO (Murray et Wynn 2011). Cela permet d'activer des mécanismes de défense facilitent la clairance des pathogènes et des débris cellulaires issus de l'apoptose des cellules infectées ou lésées. Afin de limiter les dommages tissulaires et dans l'objectif de retourner à une homéostasie tissulaire, les MoDMacs peuvent favoriser le développement d'un environnement anti-inflammatoire par la production de cytokines adaptées et/ou entrer en apoptose induisant ainsi la résolution de l'inflammation (Oishi et Manabe 2018). Une fois l'inflammation résolue, les MoDMacs disparaissent, ils sont transitoires, ce qui les distingue des ResMacs (Gautier et al. 2013).

Cependant, lorsque le déclencheur de l'inflammation subsiste, une inflammation chronique se met en place. Les macrophages peuvent engendrer d'importants dommages tissulaires collatéraux en raison d'un dérèglement fonctionnel découlant d'une surexposition au pathogène. Leur activité devient toxique, la réponse inflammatoire n'est plus contrôlée et les macrophages peuvent contribuer à la progression de la maladie. C'est notamment le cas au cours de maladies inflammatoires pulmonaires (Vlahos et Bozinovski 2014), dans la sclérose en plaque (Shemer et al. 2015; Wlodarczyk et al. 2015) et au cours de l'athérosclérose (Gisterà et Hansson 2017; Moore et Tabas 2011).

3. Processus de l'athérosclérose

D'un point de vue anatomique, la paroi artérielle saine est composée de trois tissus concentriques. L'adventice à l'extérieur, constituée de fibres de collagènes et de fibroblastes, est un support pour les structures environnantes. La média est la partie essentielle de la paroi composée de couches fibro-musculaires concentriques

constituées de cellules musculaires lisses (CML) plongées dans une MEC. La média est bornée par une lame limitante externe proche de l'adventice et d'une lame limitante interne près de l'intima. L'intima est un endothélium dont les cellules sont en contact avec le sang dans la lumière du vaisseau. Ces cellules reposent sur une membrane basale qui est séparée de la limitante interne par un espace sous endothélial, lieu de développement des lésions d'athérosclérose (*Figure 8*).

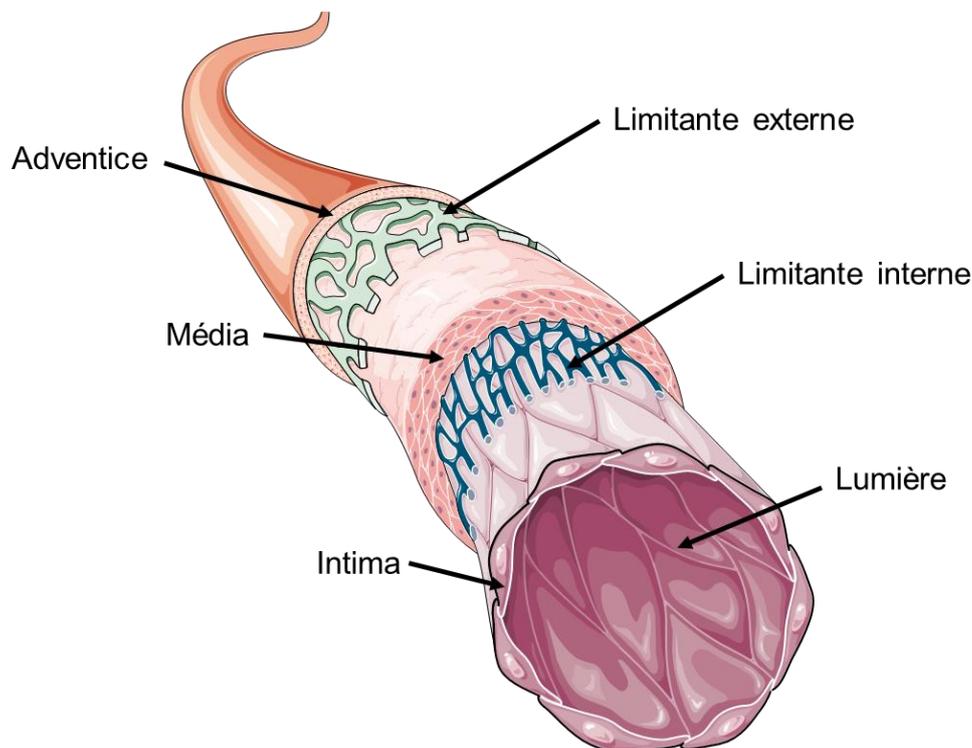


Figure 8 : Représentation schématique de la structure du mur artériel

Il est communément admis que la pathogénèse de l'athérosclérose se déroule en trois phases : l'initiation, la progression et la résolution à laquelle peuvent s'associer certaines complications.

a. L'initiation

L'athérosclérose est initiée en grande partie par l'accumulation de lipoprotéines dans la région intimale du vaisseau. Cela conduit à l'activation des cellules épithéliales sus-jacentes par un mécanisme qui implique fortement les lipides oxydés et pro-inflammatoires générés dans l'intima. Les monocytes circulants adhèrent à l'endothélium activé et entrent dans l'intima où ils se différencient en macrophages.

Ces macrophages vont prendre en charge les lipoprotéines et se gorger de CE devenant ainsi des cellules dites spumeuses (*Figure 9*).

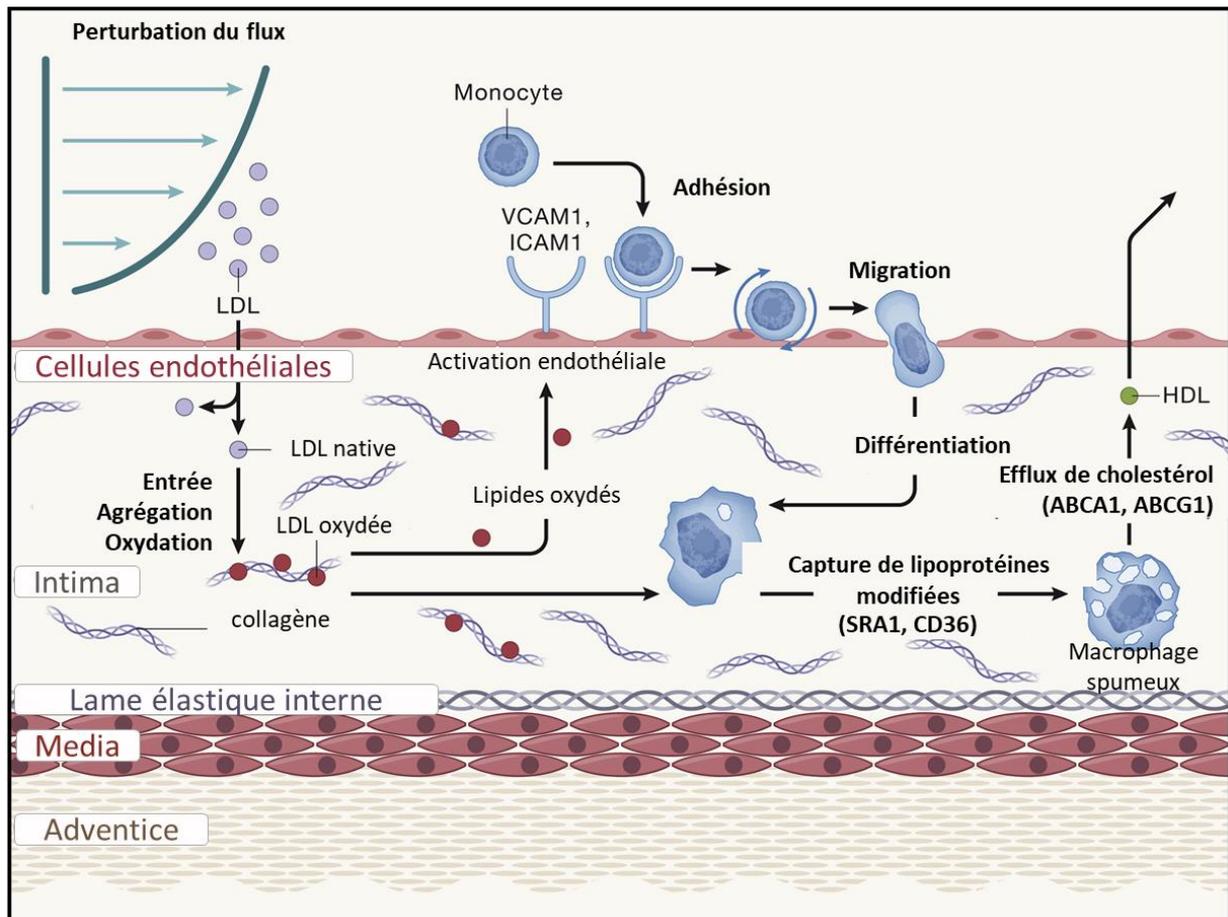


Figure 9 : Mécanismes impliqués dans l'initiation de la lésion

(Adapté de Björkegren et Lüscher 2022)

Ci-dessous, nous insisterons sur les interactions cellulaires et moléculaires impliquées dans l'initiation de la lésion.

En condition physiologique, le sang s'écoule selon un flux dit « laminaire » c'est-à-dire qu'il s'écoule dans une même direction sans que les différences locales le perturbent dans la majorité du réseau artériel. Toutefois, au niveau de bifurcations, comme les carotides, le flux est perturbé, devient turbulent et impacte l'**endothélium**. Ce phénomène est accéléré par l'accumulation de lipoprotéines conduisant à une perturbation de l'alignement cellulaire et au relâchement des jonctions serrées qui joignent les cellules endothéliales. De nombreuses voies de signalisations ont été mises en évidence dans ce mécanisme, notamment BMP-TGF β , WNT et Notch (Souilhol et al. 2020).

La perméabilité de l'endothélium conduit à l'entrée de **LDL** vers l'espace sous-endothélial selon un mode de transport transcellulaire ou au niveau des jonctions intercellulaires (Zhang, Sessa, et Fernández-Hernando 2018).

Les LDL retenues dans l'intima peuvent être modifiées par plusieurs processus pro-athérogènes comme la lipolyse et l'agrégation mais aussi particulièrement par l'oxydation, notamment à travers les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par l'endothélium activé (Steinberg et Witztum 2010). Cette activation implique l'expression de facteurs chimiotactiques MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1) et CX3CL1 (C-X3-C motif chemokine ligand 1) (Charo et Taubman 2004) et des molécules d'adhésion comme la P-selectin, E-selectin, VCAM1 (vascular cell adhesion molecule 1) et ICAM1 à la surface des cellules endothéliales favorisant l'adhésion des monocytes et leur entrée dans l'intima (Cybulsky et Gimbrone 1991).

Il est important de noter que si de nombreuses études ont suggéré que l'**oxydation des LDL** (LDLox) jouait un rôle crucial dans le recrutement de cellules immunitaires, tout n'a pas été prouvé in vivo et le mécanisme reste à être clairement identifié. Cela a conduit certains à conclure que l'agrégation de LDL pouvait aussi être un mécanisme déclencheurs de l'inflammation (Libby 2021).

Néanmoins et en soutien à l'hypothèse en faveur d'un rôle des LDLox dans l'initiation de la pathologie, une étude a montré que l'expression transgénique d'un anticorps dirigé contre les phospholipides oxydés permettait de réduire les lésions d'athérosclérose chez la souris (Que et al. 2018).

De plus, les lipoprotéines peuvent subir une oxydation au sein des lysosomes des macrophages. L'inhibition de cette oxydation par cystéamine bloque, voire résorbe, la maladie dans un modèle d'athérosclérose chez la souris (Ahmad et al. 2021). Notons que dans cette étude, le LDLox est une conséquence du recrutement immunitaire et ne peut en être le déclencheur puisque l'oxydation est réalisée au sein du macrophage.

D'autre part, il a été montré récemment que l'octanol, un produit issu de l'oxydation des lipides, pouvait se lier au récepteur olfactif 2 au niveau des macrophages vasculaires, activer la voie NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) de l'inflammasome et induire la sécrétion d'IL1b. Bloquer ce récepteur réduisait le développement de l'athérosclérose quand augmenter le taux d'octanol favorisait la maladie (Orecchioni et al. 2022).

Enfin, des études ont suggéré que l'oxydation des lipides intestinaux pouvait contribuer à l'induction d'une inflammation systémique et au développement de l'athérosclérose (Mukherjee et al. 2021).

Les **monocytes** sont recrutés dans la paroi vasculaire en réponse à l'expression de protéines d'adhésion et chimiotactiques par l'endothélium. Une fois dans le tissu, ils se différencient en **macrophages** grâce au CSF1 et d'autres cytokines produites localement par l'endothélium. Des études menées sur la souris suggèrent que la quantité des macrophages est déterminée par le recrutement des monocytes dans les phases précoces mais que la prolifération locale des macrophages domine ensuite dans les lésions plus tardives (Robbins et al. 2013). Cependant dans un contexte où la prolifération des macrophages de la plaque est altérée, le recrutement monocytaire est requis tout au long du développement de la pathologie (Williams et al. 2020).

La présence de macrophages semble essentielle au développement de la pathologie puisqu'une souris hypercholestérolémique et déficiente pour le *Csf1* est quasi résistante au développement de la pathologie.

En tant que phagocytes, les macrophages assurent la clairance des LDL et des cellules apoptotiques présentes dans la paroi vasculaire. En effet, les LDL modifiées présentent à leur surface des épitopes reconnus comme des DAMPs par les PRRs à la surface des macrophages. Ainsi et contrairement à une condition physiologique où les LDL sont reconnues par le LDLR par liaison à l'APOB100, ce sont notamment le SRA1 (steroid receptor RNA activator 1) (Suzuki et al. 1997) et le CD36 (Rahaman et al. 2006) qui contribuent à l'accumulation de lipides dans les macrophages et à la formation de **cellules spumeuses**. Ces cellules sont caractérisées par la présence de nombreuses gouttelettes dans le cytoplasme constituées de CE issus de l'estérification du CL contenu dans les LDL par l'ACAT (acetyl-coA acetyltransferase 1) au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Au sein des macrophages, les gouttelettes lipidiques sont hydrolysées par autophagie, c'est la **lipophagie**. Au cours de ce processus, des phagosomes séquestrent le contenu intracellulaire et notamment les gouttelettes pour fusionner avec un lysosome qui va dégrader le CE en CL. Les transporteurs ABCA1 (ATP-binding cassette A1) et ABCG1 (ATP-binding cassette G1) présents à la surface des macrophages vont ensuite permettre de réaliser un efflux de cholestérol et de décharger ainsi la cellule des lipides accumulés (Ouimet et al. 2011).

Des études de RNAseq sur cellule unique ont notamment montré que les macrophages de la plaque chez l'homme (Depuydt et al. 2020) et la souris (Cochain et al. 2018) avaient un profil transcriptomique enrichi en *Trem2* (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) un marqueur des macrophages gorgées de lipides dans le tissu adipeux chez l'homme et la souris obèses (Jaitin et al. 2019).

b. Progression de la lésion

Les lipides et les cellules spumeuses continuent de s'accumuler au sein de l'intima et installent un état inflammatoire par la production de cytokines. D'autres leucocytes, particulièrement des lymphocytes T (LT), sont recrutés au sein de la lésion et interagissent avec les macrophages. Avec le temps, les cellules spumeuses donnent lieu à des corps nécrotiques composés de débris cellulaires et de cholestérol. De plus, les CML passent d'un phénotype quiescent et contractile à un phénotype prolifératif et migrent vers l'espace sous-endothéliale pour former une chape fibreuse qui protège la lésion contre une rupture. Certaines CML peuvent aussi se trans-différencier en « macrophage-like » et devenir des cellules spumeuses participant ainsi à la progression de la lésion (Figure 10).

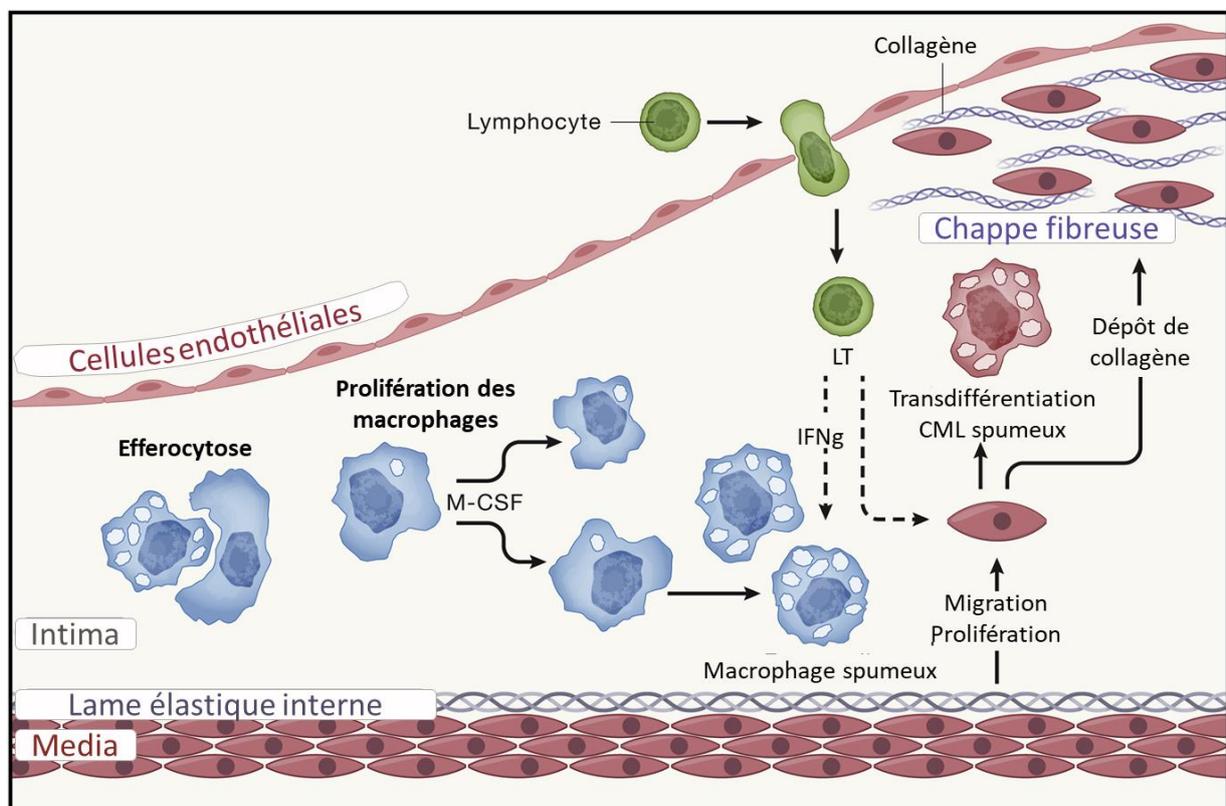


Figure 10 : Mécanismes impliqués dans la progression de la lésion

(Adapté de Björkegren et Lulis 2022)

Ci-dessous, nous insisterons sur les interactions cellulaires et moléculaires impliquées dans la progression de la lésion.

Au cours de la pathologie, l'accumulation de lipides peut conduire à un défaut d'activité de l'ACAT au sein du RE induisant un stress et favorisant l'accumulation de CL dans les macrophages (Tabas et al. 2009). Cela déclenche le mécanisme UPR (unfolded protein response) qui vise à maintenir l'homéostasie du RE lors de perturbations physiologiques telles que l'altération de la membrane plasmique, des modifications de l'homéostasie du calcium ou l'accumulation de protéines mal conformées. L'activation prolongée du système UPR, comme c'est le cas dans les macrophages au cours de l'athérosclérose, entraîne une perturbation des voies mitochondriales, la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive oxygen species) et *in fine* l'**apoptose** de ces cellules (Lee et Ozcan 2014). Les voies de signalisation impliquées ont été décrites *in vitro* et montrent une activation du facteur CHOP (C/EBP-homologous protein) qui régule la voie apoptotique dépendante des mitochondries via l'inhibition du gène *Bcl2* (B-cell leukemia/lymphoma 2) (Moore et Tabas 2011). De plus, l'accumulation du CL et la perturbation des voies calciques associées au stress du RE peuvent conduire à la formation de **cristaux de cholestérol**. Par l'intermédiaire de la protéine CAMKII (calcium/calmodulin dependent protein kinase II), les voies apoptotiques dépendantes des mitochondries peuvent là aussi être activées (Scull et Tabas 2011). Elles induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ce complexe protéique déclenche l'activation de la caspase 1 et le clivage de cytokines pro-inflammatoires comme la pro-IL1b induisant ensuite la sécrétion de la cytokine active. La caspase 1 activée conduit à la mort cellulaire (Geng et Libby 1995). En parallèle, la CAMKII active les voies apoptotiques indépendantes des mitochondries (Scull et Tabas 2011) (*Figure 11*). Les **cytokines pro-inflammatoires** activent un mécanisme de clairance des débris cellulaires appelés **efferocytose** basé sur la production de signaux « find me » pour recruter les phagocytes sur le site de l'apoptose et des signaux « eat me » pour favoriser l'interaction cellulaire (Ravichandran 2011).

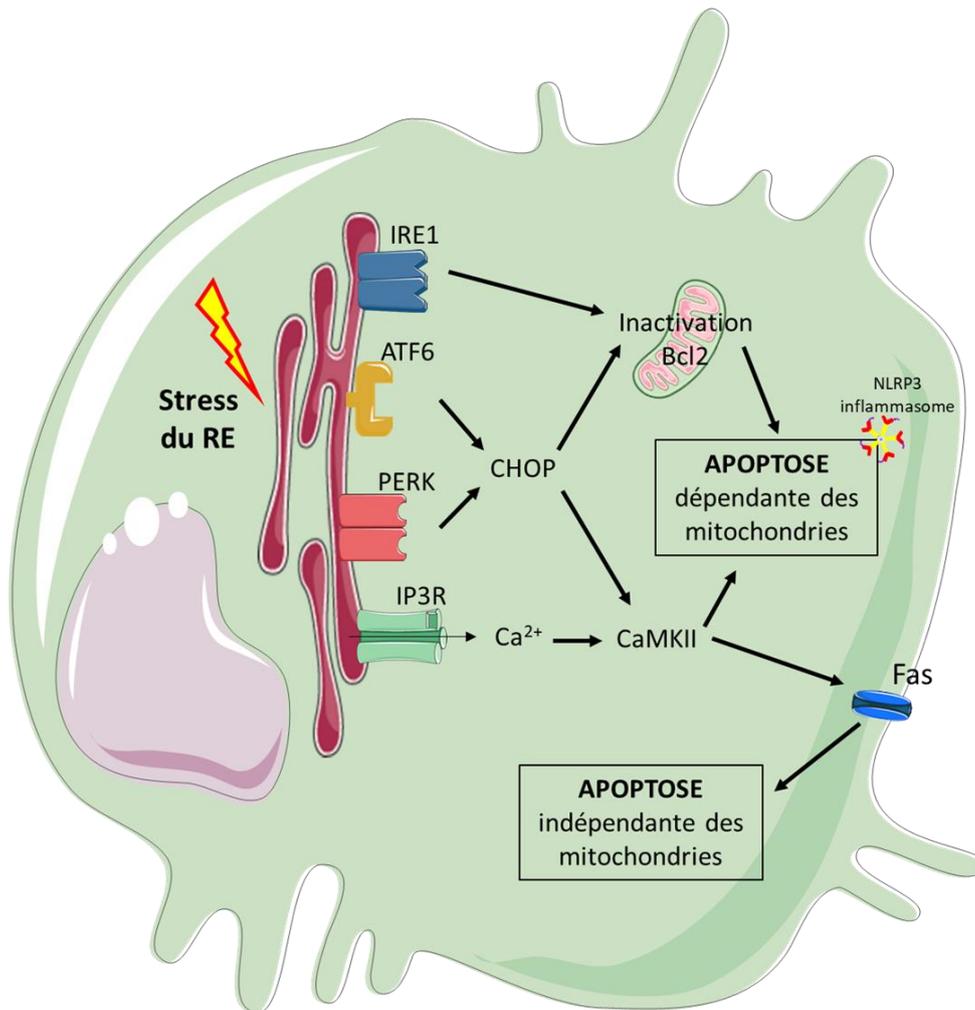


Figure 11 : Voies d'induction de l'apoptose d'un macrophage au cours du stress du réticulum endoplasmique

(D'après Scull et Tabas 2011)

Au sein du laboratoire il a d'ailleurs été montré que l'apoptose des macrophages était un mécanisme prépondérant dans la gravité de la maladie. En effet, à partir d'un modèle de délétion de l'anti-apoptotique *Bcl-x* dans les macrophages, l'équipe a montré que favoriser l'apoptose des macrophages contribuait à augmenter la cholestérolémie et accélérât l'expansion des lésions avancées d'athérosclérose (Shearn et al. 2012). Au contraire, dans un modèle transgénique, l'expression de l'anti-apoptotique mitochondrial BCL2 dans les macrophages limitait leur apoptose et augmentait leur nombre et la taille des lésions lipidiques en phase précoce. A l'inverse lorsque les mécanismes d'efferocytose deviennent déficients en phase tardive, favoriser la survie des macrophages a démontré une diminution des lésions

d'athérosclérose contenant moins de cellules mortes. Cette surexpression de *Bcl2* était toutefois associée aussi à une baisse de la cholestérolémie (Gautier et al. 2009).

D'autre part, les macrophages spumeux produisent des facteurs de croissance qui entraînent la **migration des CML** depuis la media vers l'intima qui passent d'un phénotype quiescent contractile à un phénotype prolifératif et sécrétoire. Ainsi certaines y secrètent des composants de la MEC, majoritairement du collagène, pour cloisonner la lésion et empêcher sa rupture au niveau vasculaire : c'est la chape fibreuse. D'autres subissent une transdifférenciation qui leur permet de se gorger de lipides et de devenir des cellules spumeuses (Pan et al. 2020). On estime, grâce à des modèles murins, qu'elles représentent 50% des cellules spumeuses de la plaque (Basatemur et al. 2019).

Si l'immunité innée joue clairement un rôle dans le développement de la pathologie, l'immunité adaptative est impliquée dans la progression de la maladie. A l'interface de ces systèmes, les DCs, qui portent des antigènes liés à l'athérosclérose (Bobryshev et Lord 1998) activent les LTs au niveau des nœuds lymphatiques qui rejoignent la lésion par chimiotactisme. Chez l'homme comme chez la souris, les LTH1 sont les plus abondants, ils sécrètent de l'interféron gamma (IFN γ) et permettent la croissance de la plaque en favorisant le recrutement monocytaire et la formation de macrophages spumeux (Frostegård et al. 1999; Gupta et al. 1997). Les LTH17, qui produisent l'IL17, représentent une population minoritaire au sein de la plaque mais semblent toutefois avoir un effet protecteur. En effet, les patients ayant un faible taux d'IL17 ont un risque accru de voir survenir un accident cardiovasculaire (Simon et al. 2013). Chez la souris, l'IL17 stimule la synthèse de collagène au niveau des CML et favorise la stabilité de la plaque (Gisterå et al. 2013). Les LT régulateurs (LTreg), bien qu'en faible quantité, sont retrouvés à tous les stades de développement dans les plaques d'athérosclérose humaines (Boer et al. 2007). Chez la souris, leur nombre varie entre les expériences menées mais jouent un rôle athéroprotecteur (Ait-Oufella et al. 2006) par l'intermédiaire de la cytokine anti-inflammatoire IL10 (Mallat et al. 1999) (*Figure 12*).

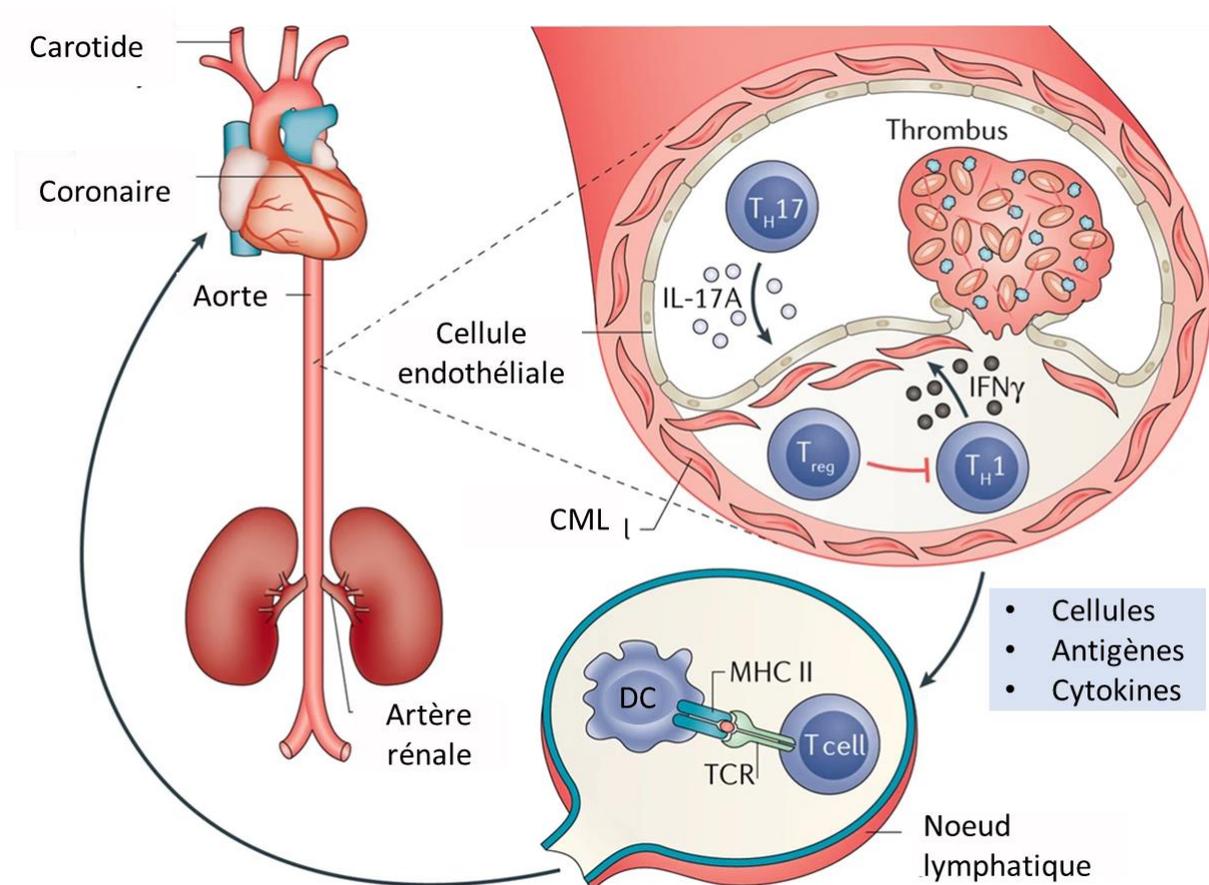


Figure 12 : Rôle des lymphocytes T au cours de l'athérosclérose

(Adapté de Gisterå et Hansson 2017)

Les **lymphocytes B** (LB) ne sont retrouvés qu'occasionnellement dans les plaques humaines (Jonasson et al. 1986) et murines (Zhou et Hansson 1999). On distingue deux sous populations, la B1 dont les anticorps ont un effet anti-athérogène et la B2 pro-athérogène (Sage et al. 2019). Leurs fonctions et leurs mécanismes sont globalement peu décrits. Toutefois, l'attention a été portée sur les anticorps IgM produits par les B1 montrant qu'ils ont la particularité de cibler les épitopes spécifiques à l'oxydation présents sur les LDLox et favoriser leur élimination (Chou et al. 2009).

De récentes études menées sur les souris et l'homme ont montré une corrélation entre l'augmentation de l'hématopoïèse, le processus par lequel les globules rouges sont renouvelés dans le compartiment sanguin et l'athérosclérose (Heyde et al. 2021). En effet, ce processus est suractivé en cas de stress, de tabagisme et lors d'une alimentation déséquilibrée, autant de facteurs de risques de l'athérosclérose. Plus

particulièrement, l'hyperlipidémie entraîne une hématopoïèse induite par l'accumulation de cholestérol dans les membranes et la diminution de l'efflux via ABCA1 et ABCG1 (Morgan et al. 2020; Schloss, Swirski, et Nahrendorf 2020). Les globules rouges peuvent entrer dans la lésion et le cholestérol qu'ils soutiennent contribuer à l'expansion du dépôt lipidique de la plaque (Jeney, Balla, et Balla 2014).

c. Résolution et complications

Au cours de l'athérosclérose, une balance inflammatoire se met en place afin de restaurer l'homéostasie tissulaire. En effet, en réponse aux cytokines pro inflammatoires produites, une réorientation du profil inflammatoire se met en place grâce à des lipides (résolvines et lipoxines), des protéines et du NO qui orientent les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire et la sécrétion de TGF β (transforming growth factor beta) et d'IL10 (Bäck et al. 2019) (Figure 13).

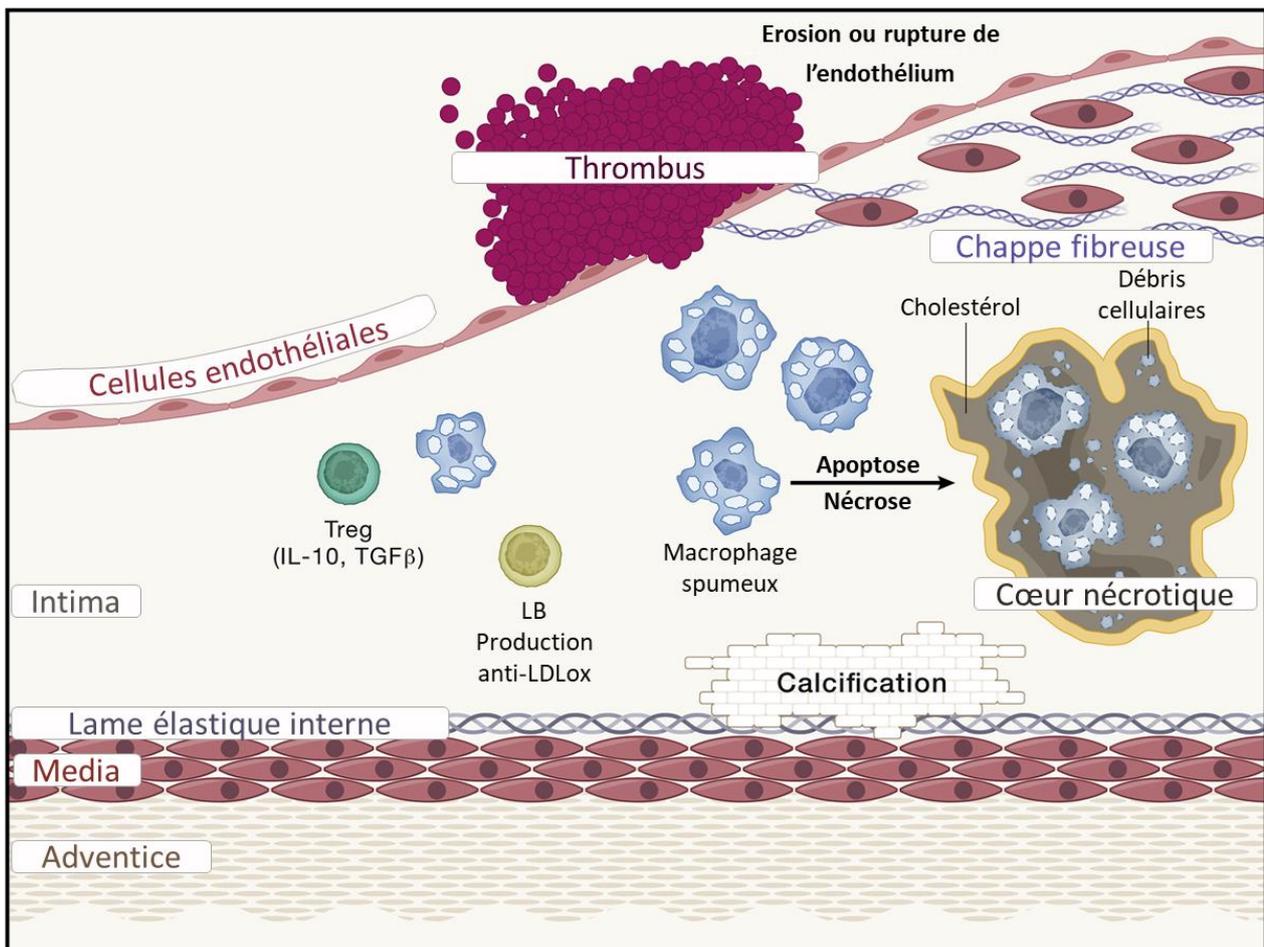


Figure 13 : Mécanismes impliqués dans les lésions avancées

(Adapté de Björkegren et Lüscher 2022)

L'efferoctose mise en place pour éliminer les débris cellulaires participe aussi à cette résolution et déclenche une reprogrammation des phagocytes vers un phénotype anti-inflammatoire (Gerlach et al. 2021; Ortega-Gómez, Perretti, et Soehnlein 2013).

Toutefois, dans le cas d'une inflammation chronique comme dans l'athérosclérose, ce mécanisme peut être mis en défaut ce qui conduit à la formation du **cœur nécrotique** caractéristique des lésions avancées (Yurdagul et al. 2017).

Les lésions avancées sont recouvertes d'une chape fibreuse. Elle est composée de collagène, d'élastine et d'amas cellulaires. Il a longtemps été décrit que les principales cellules impliquées dans la production de cette chape étaient les CML, mais de récentes expériences suggèrent que les macrophages et les cellules épithéliales y participent aussi (Newman et al. 2021).

En parallèle, que ce soit chez l'homme ou la souris (Alencar et al. 2020), parmi les CML en transdifférenciation, certaines ont pu acquérir un profil d'ostéochondrocytes (Speer et al. 2009). Elles induisent la formation de granules de calcium par l'expression de BMP1 (bone morphogenetic protein 1), BMP4 (bone morphogenetic protein 4), et la protéine matricielle GLA (galactosidase alpha). *In fine*, cela conduit à la calcification de la lésion et à sa stabilité (Basatemur et al. 2019; Mori et al. 2018).

La stabilité de la plaque détermine, en grande partie, les complications qui peuvent surgir. En effet on distingue les plaques stables, avec une chape fibreuse majoritaire et épaisse qui les protège, des plaques instables ou vulnérables dont le cœur lipidique est développé et la chape fibreuse fine. Ces dernières sont les plus sujettes à ce qu'on appelle « la **rupture de plaque** ». Lorsqu'une plaque se rompt, le contenu intérieur est exposé au compartiment vasculaire, formant un thrombus qui est la principale cause des infarctus du myocarde (Bentzon et al. 2014; Libby 2013).

Sur le pan clinique, les plaques semblent être de moins en moins inflammées et gorgées de lipides et davantage fibreuses (Pasterkamp, den Ruijter, et Libby 2017) ce qui laisse à penser qu'elles seraient moins prédisposées à se rompre car physiquement plus solides. Cependant, les syndromes d'atteintes coronaires sont en augmentation. Un autre mécanisme thrombotique est donc en cause : **l'érosion**. Peu d'études ont encore été menées pour le comprendre mais des pistes laissent penser que les neutrophiles seraient en cause. Rares au sein des lésions et induits par les lipides oxydés chez la souris (Dou et al. 2021), ils seraient à l'origine de NETs

(neutrophil extracellular traps), un processus cellulaire au cours duquel les neutrophiles piègent des éléments biologiques. Aussi, ils secréteraient des métalloprotéinases, des protéases impliquées dans la dégradation de la MEC (Libby 2021). Le tout favoriserait l'érosion de l'endothélium sus-jacent la plaque et accélérerait l'apparition de thromboses. On distingue d'un côté les « thrombus rouges » caractérisés par la formation d'un caillot sanguin composé des éléments de plaques instables, de fibrine et de globules rouges. De l'autre, les thrombus blancs issus de l'érosion d'une plaque stable et composé en grande partie de MEC et de NETs (Bentzon et al. 2014) (*Figure 14*).

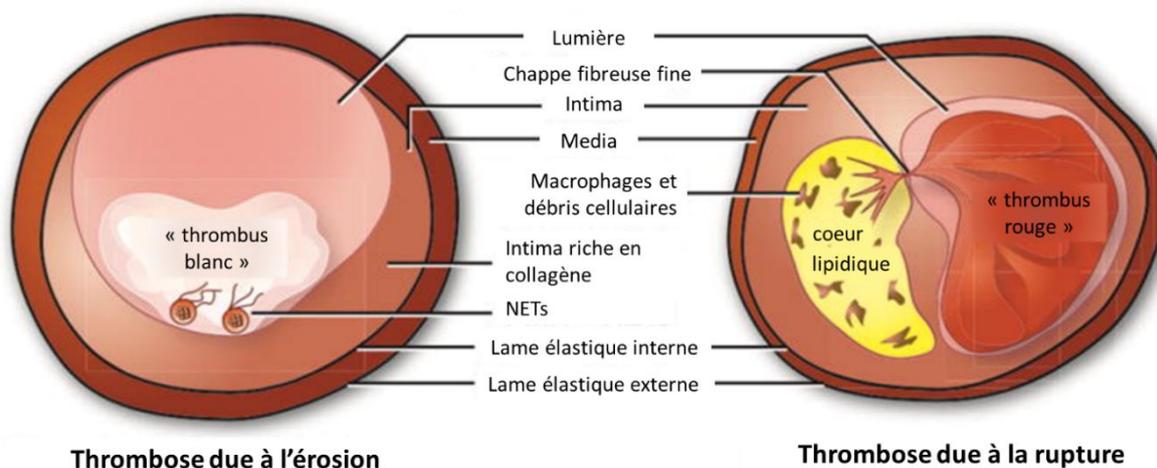


Figure 14 : Comparaison et origines des thromboses

(Adapté de Quillard et al. 2017)

4. Comparatif homme/souris et modèles d'études

La plupart des mécanismes biologiques impliqués dans l'émergence des MCV ont été identifiés à partir de modèles animaux. Initialement, les lapins et hamsters étaient les modèles couramment utilisés car ils développaient des lésions athérosclérotiques significatives une fois placés sous des régimes riches en lipides. Cependant, la multitude d'outils génétiques dont on dispose chez la souris, a fait de cet animal le modèle de recherche phare pour l'athérosclérose et les MCV.

Il existe deux modèles majeurs qui ont permis de valider le rôle de gènes candidats chez l'homme, d'évaluer les interactions environnementales, de développer des

thérapeutiques et d'identifier les gènes impliqués dans le développement de la pathologies (Daugherty et al. 2017; von Scheidt et al. 2017).

Ces modèles sont :

- ***Ldlr*^{-/-}** : initialement décrit chez le lapin dans les années 80, ce modèle est développé quelques années plus tard chez la souris grâce aux travaux d'Ishibashi (Ishibashi et al. 1993). Le *Ldlr* y est délété ce qui induit une accumulation de ces lipoprotéines dans le plasma et le développement d'une hypercholestérolémie tout particulièrement lorsque les souris sont nourries avec un régime enrichi en graisse et en cholestérol. C'est le modèle de l'hypercholestérolémie familiale.
- ***ApoE*^{-/-}** : dans ce modèle généré par l'équipe de Maeda en 1992 (S. H. Zhang et al. 1992), la lipoprotéine *ApoE* est délétée ce qui limite la clairance des particules riches en CE dans le plasma et induit une hypercholestérolémie et un contexte pro-inflammatoire.

Cependant, l'injection d'un adénovirus surexprimant la protéine PCSK9, et des formes gain de fonction de celle-ci, est de plus en plus utilisée puisque cela permet d'induire une hypercholestérolémie sans passer par la génération de lignées de souris au fond génétique modifié (Goettsch et al. 2016).

Il est important de noter qu'il n'y a pas de développement spontané de plaques d'athérosclérose chez la souris. Cela nécessite de les mettre sous des régimes hyperlipémiants pour induire une hypercholestérolémie. Le régime classiquement utilisé est le Western diet (WD) composé à 21% de lipides et 0,2% de cholestérol. D'autres régimes existent, et particulièrement certains enrichis exclusivement en cholestérol. Toutefois sous un régime standard (CD), les souris *ApoE*^{-/-} ont une cholestérolémie plus élevée que les *Ldlr*^{-/-} et développent un profil plus inflammatoire.

Chez l'homme, les lésions se développent au fil des années au niveau des artères coronaires, des carotides et des artères périphériques de gros et moyens calibres tandis que chez la souris on les retrouve au bout de quelques mois localisées au niveau du sinus aortique, de la crosse aortique et de l'aorte descendante. De plus, les plaques de souris se rompent très rarement alors que chez l'homme la rupture de plaque est à l'origine, dans $\frac{3}{4}$ des cas, de thrombose et de crise cardiaque. Cependant, tout récemment un modèle de ligation de l'artère coronaire a montré l'induction d'une

rupture de plaque dont les caractéristiques sont similaires à l'homme (Noonan, Bobik, et Peter 2022).

Malgré ces différences, la souris reste un modèle qui récapitule en grande partie la pathologie observée chez l'homme. En effet, la pathogénèse, ses mécanismes cellulaires et moléculaires ainsi que les facteurs de risques qui l'induisent sont semblables à ceux observées chez l'homme. En ce sens, l'analyse comparée GWAS des signalisations cellulaires, qui contribuent au développement de l'athérosclérose chez la souris et l'homme, montre une superposition considérable des voies entre les deux espèces (von Scheidt et al. 2017).

Partie 2 : Le foie : un organe majeur de l'homéostasie du cholestérol

I. Une structure au service de sa fonction

Le foie est un organe essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Il est responsable d'un large éventail de fonctions et a un rôle primordial dans le métabolisme du cholestérol.

1. Structure

a. Développement

Dès le début de la 4^{ème} semaine de développement, apparaît un bourgeonnement au niveau de l'intestin primitif antérieur, induit par les voies Wnt/B-catenine et FGF (Si-Tayeb, Lemaigre, et Duncan 2010), qui donne naissance au diverticule hépatique. Il se développe rapidement et interagit avec le septum transversum, une structure qui divise le cœur de la cavité abdominale et qui contribue par la suite à la formation du diaphragme. D'un côté, les cellules endodermiques des parties proximales du diverticule s'allongent pour donner les voies biliaires extra-hépatiques et le canal cholédoque. De l'autre, les parties distales se différencient en hépatocytes et permettent, sous l'impulsion du facteur VEGF (Si-Tayeb, Lemaigre, et Duncan 2010), la formation des ébauches vasculaires pour constituer le parenchyme.

La veine porte, qui dérive des veines du cordon ombilical et du sac vitellin, est le vaisseau central autour duquel les travées hépatiques se forment. Cela peut expliquer pourquoi c'est par la veine porte et non par les artères hépatiques que le foie reçoit les premiers afflux sanguins. En effet, les artères hépatiques se développent avec le tractus biliaire jusqu'après la naissance (Saxena, Theise, et Crawford 1999).

Enfin, dès la 6^{ème} semaine de développement, le foie est capable d'assurer une fonction hématopoïétique.

b. Localisation

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme et un des organes les plus densément vascularisés. Il contient plus de 10% du volume sanguin total et est

traversé par 1,4L de sang chaque minute chez l'adulte. Situé dans la cavité abdominale, il est séparé des poumons et du cœur par le diaphragme sous lequel il se situe à droite de l'estomac.

Chez l'homme comme chez la souris, le foie est divisé en 4 lobes inégaux et la vésicule biliaire est attachée au plus volumineux d'entre eux. Le foie est recouvert d'une fine membrane appelée la capsule formée de deux couches. La couche externe séreuse reliée au péritoine et une couche interne fibreuse appelée la capsule de Glisson. Le sang arrive au foie au niveau du pédicule sous-hépatique composé de la veine porte et de l'artère hépatique qui véhiculent du sang désoxygéné et oxygéné respectivement. La veine porte est la réunion des veines issues de l'intestin, du pancréas et de la rate et apporte 75% du sang entrant, tandis que seulement 25% du sang arrive par l'artère hépatique. Le sang est filtré dans le foie au niveau du réseaux de sinusoides hépatiques et ressort par la réunion de trois veines constituant le pédicule sus-hépatique qui se jette dans la veine cave (*Figure 15*).

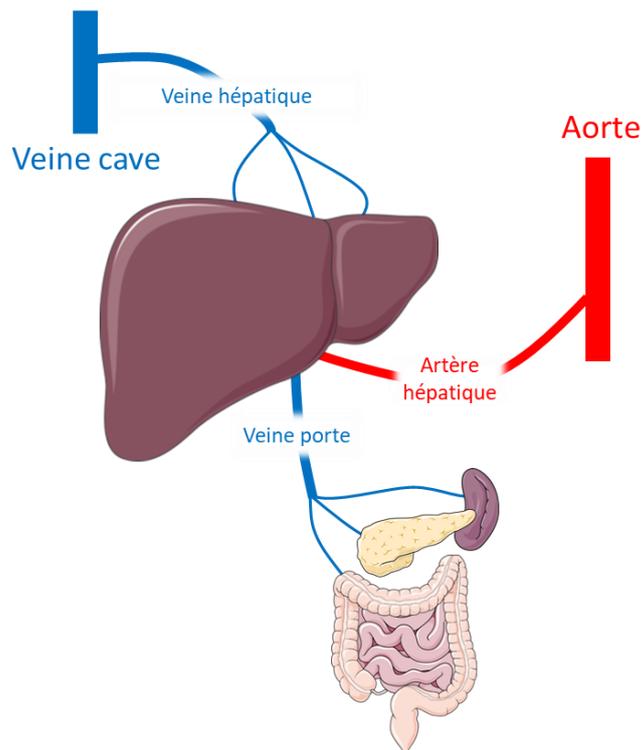


Figure 15 : Grandes voies de la vascularisation hépatique

L'unité fonctionnelle du foie est appelée lobule. C'est une structure polygonale constituée de travées hépatiques monocellulaires organisées autour d'une veine centrale et délimitée en périphérie par des triades hépatiques. La triade hépatique est

une association de trois canaux réunissant une ramification de la veine porte, une de l'artère hépatique et un canal biliaire (*Figure 16*). De part cette organisation, il existe un gradient d'oxygène et de nutriments depuis la triade hépatique jusqu'à la veine centrale. Cela crée une polarisation fonctionnelle au sein du lobule où les hépatocytes expriment des gènes et présentent un métabolisme différent en fonction de leur localisation : c'est la zonation hépatique (Droin et al. 2021).

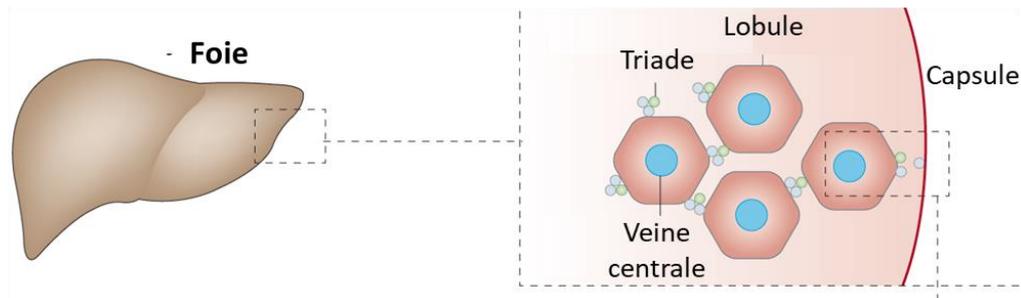


Figure 16 : Organisation fonctionnelle du foie

2. Acteurs cellulaires

Le foie est un organe hétérogène qui abrite une grande variété de types cellulaires (*Figure 17*).

a. Hépatocytes

Responsables des fonctions principales du foie, les hépatocytes représentent 80% de sa masse. Ce sont de larges cellules épithéliales polarisées et de forme polygonales possédant un ou deux noyaux ronds. Leur pôle sinusoidal est situé au niveau basolatéral de la cellule et est en contact avec la MEC de l'espace de Disse, un espace situé entre les hépatocytes et les cellules endothéliales. Les villosités de la membrane plasmique à ce pôle augmentent la surface d'échange avec les éléments du sang. Leur pôle biliaire ou apical est le lieu de sécrétion des acides biliaires dans les canalicules biliaires. Le canalicule biliaire est un sillon formé de proche en proche par deux hépatocytes d'une même travée, dans lequel est déversé la bile collectée au niveau du canal biliaire de chaque triade hépatique. Enfin, le pôle latéral assure cohésion et échange entre les différents hépatocytes.

En dehors de leur rôle de stockage, la quantité importante de mitochondries et le large réseau de RE qu'abrite leur cytoplasme témoignent d'une activité métabolique abondante et d'une synthèse protéique intense.

Les hépatocytes jouent aussi un rôle majeur dans la modulation de la réponse immunitaire inné (Zhou, Xu, et Gao 2016). En effet, en réponse à un stimulus inflammatoire, ils produisent rapidement une variété de protéines immunitaires appelées protéines de la phase aiguë. Elles peuvent directement neutraliser des pathogènes ou activer d'autres acteurs du système immunitaire. Parmi ces protéines, on retrouve la Protéine C réactive, un pentamère capable de se fixer aux polysaccharides à la surface des bactéries et d'activer le système du complément.

b. Les cellules étoilées

Le foie abrite une population de cellules de forme étoilée localisées dans l'espace de Disse. Initialement décrite par von Kupffer (Kupffer 1876), on les appelle cellules étoilées ou HSC (Hepatic Stellate cell).

En condition physiologique, elles sont quiescentes et sont le site principal de stockage de Vitamine A (Geerts 2001). En condition inflammatoire, elles participent à l'induction de la réponse immunitaire par la production de cytokines (Friedman 2008). Aussi, elles sont capables de se trans-différencier en myofibroblastes qui produisent des composants de la MEC comme des glycoprotéines et du collagène. Elles jouent ainsi un rôle majeur dans le développement de la fibrose hépatique (Tsuchida et Friedman 2017).

c. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ou LSECs (Liver Sinusoidal Endothelial Cells) forment un endothélium unique sans membrane basale et dont les cellules sont disjointes en partie. On dit qu'il est fenestré. Ces LSECs forment les sinusoides hépatiques. Situées à l'interface entre la circulation sanguine et le parenchyme hépatique, leurs fenestrations permettent d'établir des contacts entre les hépatocytes et les éléments de la circulation. Cette structure forme ainsi une frontière perméable et est à l'origine de quelques fonctions biologiques. Les LSECs sont impliquées dans le maintien d'une faible pression sanguine au niveau de la veine porte, qui permet de ralentir les antigènes et les particules circulantes pour favoriser leur capture et leur élimination. Fortes de leur activité endocytaire intense, les LSECs participent à l'élimination de ces

éléments, jouant ainsi un rôle immunitaire. La présence de PRRs à leur surface, comme des TLRs, leur permet de reconnaître des PAMPs. De plus, elles sont capables d'adapter leur réponse par l'activation de l'inflammasome et la production de cytokines. D'autre part, en condition basale les LSECs maintiennent les cellules étoilées sous forme quiescente. Cependant, dans des contextes pro-fibrotiques chez le rat, les fenestrations se cloisonnent et les LSECs ne parviennent plus à maintenir les cellules étoilées dans un état quiescent favorisant ainsi leur activation et leur transdifférentiation en myofibroblastes (DeLeve, Wang, et Guo 2008).

d. Les cholangiocytes

Les cholangiocytes représentent 3-5% des cellules du foie. Ils délimitent les canaux biliaires intra et extra-hépatiques ainsi que la vésicule biliaire. La population de cholangiocytes constitue un épithélium non-classique dont les cellules sont morphologiquement et fonctionnellement hétérogènes (Firincieli et al. 2011). En effet, on distingue les petits cholangiocytes qui prolifèrent et les plus grands aux capacités sécrétoires (Marziani et al. 2002). Globalement, grâce à l'expression de diverses protéines, les cholangiocytes contrôlent la composition, le pH ainsi que le transport de la bile à l'extérieur du foie (Strazzabosco, Spirlí, et Okolicsanyi 2000).

e. Les cellules immunitaires

Par sa position unique au centre de la circulation digestive, le foie joue un rôle majeur pour détecter et combattre les infections. Ainsi pour éviter l'apparition d'infections chroniques et maintenir l'intégrité du tissu, le foie héberge un panel de cellules immunitaires majoritairement localisées au niveau des sinusoides hépatiques (Jenne et Kubes 2013).

Le foie abrite la population de macrophages résidents la plus abondante : les **cellules de Kupffer** (KCs). Localisées au niveau des sinusoides, elles jouent un rôle clé dans l'homéostasie du tissu. Leur description fera l'objet de toute la prochaine partie.

On trouve une seconde population de macrophages, les **macrophages sous capsulaires** ou LCMs (Liver Capsular Macrophage). Comme leur nom l'indique, ils sont localisés sous la capsule de Glisson et sont phénotypiquement et embryologiquement différents des KCs (Sierro et al. 2017). En effet, si les KCs ont des marqueurs spécifiques, les LCMs n'expriment que les marqueurs de macrophages

comme CD68 et F4/80 et contrairement aux KCs, cette population dérive des monocytes circulants. Fonctionnellement, les LCMs assurent une protection contre les infections péritonéales (Sierro et al. 2017).

Alors qu'ils représentent la population de granulocytes la plus présente dans le sang humain et de souris, très peu de **neutrophiles** sont retrouvés dans le foie en condition basale. Ils sont caractérisés comme des cellules LY6G⁺. Ils arrivent par la circulation sanguine et se lient à l'endothélium vasculaire par des intégrines. Dans le foie inflammé, les neutrophiles sont sensibles aux chimiokines et migrent dans le tissu lésé (Rossaint et Zarbock 2013). Ils y phagocytent des débris, libèrent des granules cytotoxiques contenant des ROS et forment les NETs (Rosales 2020), un processus au cours duquel des fibres d'ADN et de protéines sont libérées et permettent de piéger les microorganismes pathogènes.

Le foie est aussi peuplé par un panel de **cellules lymphoïdes innées** (ILCs) comprenant les cellules natural killer NK qui prédominent, les ILC1, ILC2 et ILC3. Ce sont des lymphocytes granulaires à activité cytotoxique qui, contrairement aux LT CD8⁺, n'exercent pas de réponse spécifique à l'antigène et ne nécessitent pas une activation pour réaliser leur fonction. Ainsi, on considère qu'elles appartiennent à la famille des cellules lymphoïdes innées (ILCs). L'absence de modèle spécifique de ces cellules ne permet pas d'identifier un rôle bien déterminé dans le foie.

Les **cellules dendritiques** ou DCs sont une population hétérogène dans le foie qui dérive de la circulation. En effet, dans le foie des souris on trouve des DCs conventionnels et des DCs plasmacytoïdes (David et al. 2016). Elles sont identifiées comme CD11C⁺ CX3CR1⁺ et participent à l'induction de la tolérance immunitaire par la production de prostaglandine E2.

Si peu de **cellules Natural killer T** (NKT) sont présentes dans le foie humain, cette population est particulièrement enrichie dans le foie de souris. Leur action est spécifique et médiée par un TCR (T cell receptor). Plus spécifiquement, la sous population iNKT, qui exprime le récepteur à la chimiokine CXCR6, patrouille les sinusoides hépatiques sous l'influence de la chimiokine CXCL16 exprimée par le LSECs (Geissmann et al. 2005).

Une petite proportion de **cellules du système immunitaire adaptatif** patrouille dans le foie. On trouve des LT de type CD4⁺ et CD8⁺αβ (Fernandez-Ruiz et al. 2016; Steinert et al. 2015) qui confèrent au tissu une première ligne de défense contre les réinfections, ainsi que des LB et des plasmocytes majoritairement localisés au niveau des voies portales pour produire des anticorps de type IgA en réponse aux bactéries et antigènes provenant du tractus intestinal (Moro-Sibilot et al. 2016).

Enfin, on trouve quelques rares **monocytes** dans la circulation hépatique. D'une part, les monocytes non-classiques LY6C⁻ CX3CR1⁺ qui patrouillent les sinusoides pour maintenir l'homéostasie vasculaire en éliminant les cellules endothéliales infectées ou mourantes (Carlin et al. 2013). D'autre part, les monocytes classiques Ly6C⁺ CX3CR1⁻ qui sont recrutés dans le tissu en cas d'inflammation et peuvent se différencier en DCs ou en macrophages (Chomarat et al. 2001; Jakubzick, Randolph, et Henson 2017). Les **macrophages dérivés des monocytes** ou MoDMacs sont une population hétérogène et plastique générée dans un contexte physiopathologique.

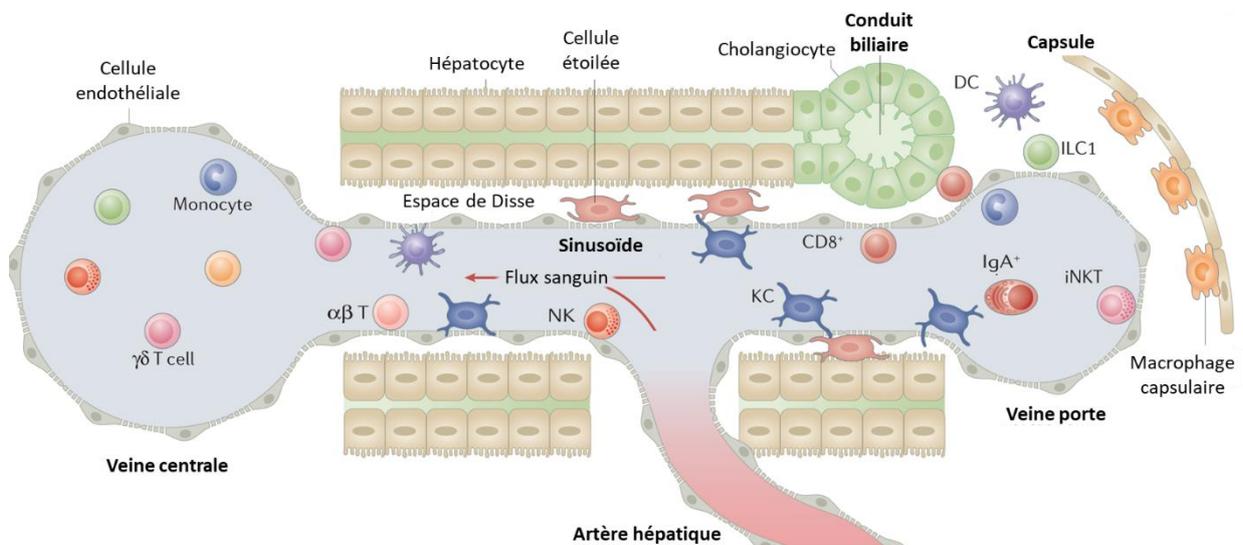


Figure 17 : Populations immunitaires au sein d'une triade hépatique

(Adapté de Huby et Gautier 2021)

3. Fonctions

Le foie a une place centrale dans le métabolisme des mammifères et notamment chez l'homme et la souris. Sa localisation idéale lui permet de récolter les nutriments issus de l'absorption intestinale mais aussi d'être une première ligne de défense contre les pathogènes, les produits dérivés microbiens et les métabolites des médicaments.

Ses rôles multiples ont pour objectifs principaux :

- Le stockage et la répartition des nutriments issus de la digestion
- La production de la bile
- La dégradation de substances toxiques
- La synthèse de protéines sanguines

a. Détoxification

Certaines substances qui arrivent au foie sont toxiques pour l'organisme. Le foie va donc procéder à une purification du sang, notamment celui provenant de la veine porte qui contient les éléments issus de l'absorption intestinale.

Les éléments liposolubles vont être reversés dans la bile qui sera déversée dans l'intestin. Ils seront donc éliminés au niveau des fèces. Les éléments hydrosolubles vont être reversés dans le sang veineux, passer par les reins et être éliminés dans les urines.

- L'ammoniac qui est naturellement produite par le colon lors de la décomposition du contenu digestif, possède une forte toxicité neurologique. Menée jusqu'au foie par la veine porte, elle va être dégradée par les hépatocytes, transformée en urée et éliminée dans l'urine.
- Le foie joue aussi un rôle clé dans la décomposition de l'hémoglobine. Si chez la souris, la demie vie d'un globule rouge est d'environ 20 jours, chez l'homme elle est de 120 jours. A ce stade, les globules rouges doivent être détruits dans la rate où la dégradation de l'hémoglobine produit de la bilirubine libre toxique pour l'organisme. Arrivée au foie par la veine porte, elle est modifiée en bilirubine conjuguée non toxique, déversée dans la bile puis éliminée par les fèces ou dissoute dans le sang et éliminée par les urines (O'Brien et al. 2015).

C'est ce qui leur donne une couleur jaunâtre. Une intensité élevée de cette couleur sert de signal à une perturbation des fonctions hépatiques.

- L'alcool arrive par le foie au niveau de la veine porte et est absorbé par les hépatocytes, transformé en acétaldéhyde puis en acétate et éliminé par voie rénale. L'alcool et l'acétaldéhyde sont toxiques pour le foie, la transformation en acétate est essentielle pour éviter le développement d'une stéatose hépatique alcoolique.
- Le foie procède à la biotransformation de certaines substances médicamenteuses majoritairement pour permettre un passage de l'état lipophile à hydrophile et leur sécrétion dans le sang. C'est « l'effet de premier passage » (Almazroo, Miah, et Venkataramanan 2017).

b. Endocrine

Le foie produit une grande partie des protéines du sang, notamment l'albumine, les globulines et les facteurs de coagulation comme le fibrinogène. Il sécrète aussi quelques hormones comme le facteur de croissance cellulaire IGF1 (insulin-like growth factor 1) et l'angiotensinogène qui permet de contrôler la pression artérielle.

En cas de dysfonctionnement hépatique, on observe donc un déficit de ces protéines dans le sang. Le manque d'albumine entraîne notamment l'ascite. Les troubles de la coagulation donnent lieu à des hémorragies.

c. Exocrine

Une fonction majeure du foie est la production de bile. La bile est un fluide qui permet l'excrétion de produit non évacués par les reins et qui aide à l'absorption et la digestion de lipides par la sécrétion de sels et d'acides biliaires. Elle est composée majoritairement d'eau, d'électrolytes, de sels et d'acides biliaires, de cholestérol, de bilirubine et de phospholipides.

La bile est produite en continue par les hépatocytes, sécrétée dans les canalicules biliaires jusqu'aux canaux biliaires et la vésicule où elle est stockée. Par cycles, elle sera déversée dans le duodénum où elle réalisera ses fonctions et sera recyclée.

d. Immunitaire

75% du sang arrivant au foie provient du système porte. Cet organe est continuellement exposé aux antigènes alimentaires, ceux de la flore intestinale et à d'éventuels microorganismes pathogènes. Ainsi il est peuplé d'un large panel de cellules du système immunitaire lui permettant de maintenir une intégrité au tissu et d'assainir le sang. De plus, les LT provenant de la rate doivent traverser le foie pour être sélectionnés avant d'atteindre la circulation systémique.

Le foie est le siège de mécanismes immunitaires complexes qui doivent combiner une tolérance aux antigènes issus de l'alimentation, une barrière contre les éventuels pathogènes tout en étant un organe clé de l'homéostasie de la population des LT.

e. Métabolisme des vitamines

Le foie est aussi l'organe de stockage et métabolisation des vitamines. La vitamine A est produite dans les cellules étoilées. Bien que la vitamine D3 provienne de la peau, des dérivés animaux ou végétaux, elle est hydrolysée de nombreuses fois par le foie avant d'être inactivée par le rein. La vitamine E est mise en circulation par le foie. Enfin, la vitamine K est essentielle pour la production de facteurs de coagulation (Kalra et al. 2022).

f. Fonction énergétique

En étroite collaboration avec le pancréas et en fonction de la prise alimentaire, il permet de stocker le glucose sous forme de glycogène (glycogénogenèse) ou de le déstocker (glycogénolyse). Aussi il est le seul organe à pouvoir synthétiser du glucose en cas de nécessité pour l'organisme, c'est la néoglucogénèse.

De leur côté, les acides gras parvenant au foie sont stockés en partie dans les hépatocytes sous forme de TG (l'association de 3 acides gras et d'un glycérol). D'autre part, en fonction des besoins énergétiques de l'organisme et sous l'action d'hormones, les acides gras peuvent être synthétisés *de novo* (lipogenèse) ou bien les TG peuvent être hydrolysés (lipolyse) et métabolisés pour fournir de l'énergie (β -oxydation). En cas de jeûne, cette voie est limitée et le foie détourne les substrats accumulés pour pallier au manque d'énergie (cétogenèse).

Un déséquilibre de la prise alimentaire conduit à des perturbations métaboliques qui peuvent mener à l'établissement d'un diabète de type 2, d'une stéatose et parfois au développement d'un cancer.

II. Métabolisme du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol est complexe et implique un équilibre entre apports alimentaires, absorption intestinale, synthèse intracellulaire et excrétion. Le foie joue un rôle prépondérant dans le maintien de cette homéostasie.

1. Les lipoprotéines : des transporteurs de choix

Afin d'assurer leur transport dans l'organisme et notamment dans le sang, les lipides sont pris en charge par des lipoprotéines. Il en existe plusieurs, de taille, de densité et de composition différentes. Voici les principales lipoprotéines (*Figure 18*).

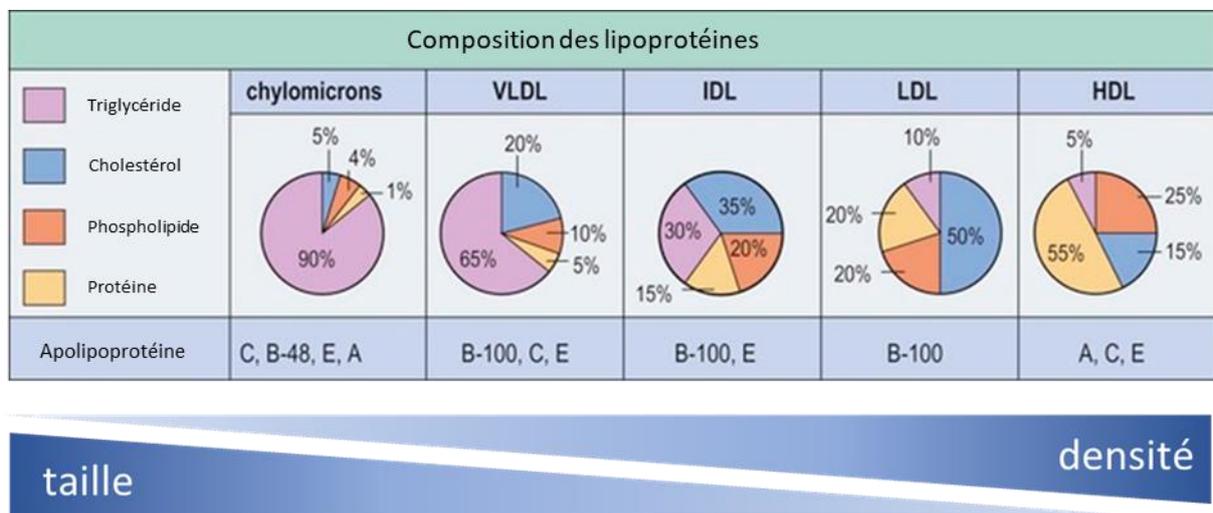


Figure 18 : Tableau récapitulatif de la composition des lipoprotéines
(Adapté de Themes 2019)

2. Apport exogène de cholestérol

Environ 300 à 600 mg de cholestérol est apporté chaque jour par une alimentation saine et équilibrée. Le cholestérol est absorbé au niveau de la membrane apicale des entérocytes du duodénum par le transporteur NPC1L1 (niemann-pick type c1 like 1) (Altmann et al. 2004) (*Figure 20. ①*) où il est estérifié par l'ACAT (Chang et al. 2009). Sous l'action de la microsomal MTP (triglyceridetransfer protein), les CE sont associés avec des TG en chylomicrons. Ces lipoprotéines passent alors dans la lymphe et sont déversés dans la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche. Ils vont alors se lier très rapidement à la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme ancrée à l'endothélium qui va hydrolyser les TG pour permettre leur transfert sous forme d'acides gras dans les tissus périphériques. Ce catabolisme génère la formation de lipoprotéines, appelées remnant de chylomicrons, ayant perdu une large part de leur TG et qui vont se lier via leur APOE aux hépatocytes au niveau des récepteurs LRP (LDL-receptor related protein) et LDLR et entrer dans le foie (*Figure 19. Flèches bleues*).

3. Synthèse endogène de cholestérol

Chaque jour, 1-2g de cholestérol est synthétisé par l'organisme. Si la plupart des cellules de l'organisme peuvent réaliser cette synthèse *de novo*, 50% de celle-ci s'effectue dans le foie chez l'homme (Repa et Mangelsdorf 2000). Elle est caractérisée par une succession de 30 réactions enzymatiques à partir d'acetyl-CoA et avec l'HMGR (methylglutaryl coenzyme A reductase) comme enzyme limitante (*Figure 20. ②*). Après estérification par l'ACAT, le CE peut en fonction du contexte être stocké dans la cellule au sein de gouttelettes lipidiques ou participer à la formation de lipoprotéine. En effet, le CE s'associe à des TG, des phospholipides et des APO pour former des lipoprotéines de très basse densité ou VLDL (very low density lipoprotein). Cette lipoprotéine va être sécrétée dans le sang et subir une cascade métabolique en se déchargeant de ses TG. En effet, d'abord reconnue grâce à l'APOB100 via le LRP1 et le LDLR (au niveau hépatique) et par le VLDLR (au niveau périphérique), une partie des TG contenus dans la lipoprotéine va être hydrolysée par la LPL et distribuée aux tissus pour générer une lipoprotéine de densité intermédiaire, la IDL (intermediate density lipoprotein). Cette IDL va à son tour être hydrolysée par l'hépatique lipase (HL) au niveau du foie et former la lipoprotéine de basse densité, la LDL majoritairement

composée de CE. La LDL permet de transporter le cholestérol aux tissus pour la synthèse d'hormones et le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires. Enfin, elle retourne au foie et subit une endocytose en se liant au LDLR au niveau des vésicules recouvertes de clathrine. L'acidité du compartiment endosomal induit la dissociation de la LDL et de son récepteur (Rudenko et al. 2002). Suite à cette dissociation, la LDL est dirigée vers un lysosome où la lipase acide lysosomale (LAL) va hydrolyser les CE (Dubland et Francis 2015) et permettre ainsi leur transport dans la cellule par NPC1 (Niemann-Pick C1) (Kwon et al. 2009) et NPC2 (Niemann-Pick C2) (Infante et al. 2008). De son côté, le LDLR est soit engagé dans une voie de dégradation lysosomale, soit recyclé à la surface de la cellule (*Figure 19. Flèches rouges*).

La disponibilité du LDLR à la surface des cellules est hautement régulée par le PCSK9. Cette protéine est produite par les hépatocytes et sécrétée dans le foie. Elle se fixe au niveau du LDLR et empêche sa dissociation avec la LDL dans le compartiment endosomal favorisant ainsi la dégradation du récepteur (Lagace 2014; Maxwell et Breslow 2004). Le PCSK9 a une activité à la fois autocrine, paracrine et systémique et son inhibition, couplée à celle de l'HMGCR, est une des stratégies thérapeutiques majeures chez les patients FH pour diminuer les concentrations plasmatiques de LDLc et prévenir le développement de l'athérosclérose (Fitzgerald et al. 2017 ; Raal et al. 2015).

Le régulateur majeur de cette voie de biosynthèse est le facteur de transcription SREBP2 (sterol regulatory element-binding protein 2) codé par *Srebf2* (Brown et Goldstein 1997; Horton, Goldstein, et Brown 2002). Lorsque les concentrations de cholestérol intracellulaire sont importantes, SREBP2 est retenu au sein du RE et son activité est neutralisée. Cependant si les concentrations chutent, SREBP2 entre dans le noyau et peut induire la transcription de ces gènes cibles, comme le *Ldlr*, le *Pcsk9* et l'*Hmgcr*, des acteurs clés pour le captage des LDL et de la biosynthèse du cholestérol.

4. Transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol ou (RCT) est un processus au cours duquel le cholestérol des tissus périphériques est retourné vers le foie au sein des lipoprotéines de très haute densité, les HDL. Ce mécanisme est crucial pour l'homéostasie car si

toutes les cellules sont capables de produire du cholestérol, seul le foie est capable de le cataboliser.

Les cellules intestinales et hépatiques produisent des HDL naissantes (HDLn), de forme discoïdale constituées d'APOA1 et de peu de lipides. Ces HDLn vont parcourir les tissus et capter du CL sorti au niveau des transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Kennedy et al. 2005) (*Figure 20. ③*) et estérifié par la LCAT associée aux HDL. La lipoprotéine va mûrir et s'enrichir en CE.

Dans le sang, des échanges entre lipoprotéines de composition différentes vont s'effectuer. Notamment entre les HDL riches en CE et les VLDL riches en TG grâce à la CETP (cholesteryl ester transfer protein) chez l'homme (Barter, Hopkins, et Calvert 1982; Yanan Wang et al. 2015).

Les HDL, enrichies ou non en TG, vont retourner au foie et le CE va être capté de manière sélective par le récepteur scavenger SRB1 (Acton et al. 1996) (*Figure 19. Flèches noires*).

Le RCT est un processus très actif dans les macrophages pour éviter la génération de cellules spumeuses. En effet, l'accumulation de cholestérol intracellulaire entraîne l'activation d'une batterie de facteurs de transcription comme le *Lxra* et *Lxrb* (liver X receptor a et b), le *Rxr* (retinoid x receptor) et certains membres de la famille des *Ppar* (peroxisome proliferator-activated receptor) tels que *Ppara* and *Pparg*, qui favorisent l'efflux de cholestérol notamment en induisant la transcription des transporteurs *Abca1* et *Abcg1* (Duffy et Rader 2009; Venkateswaran et al. 2000).

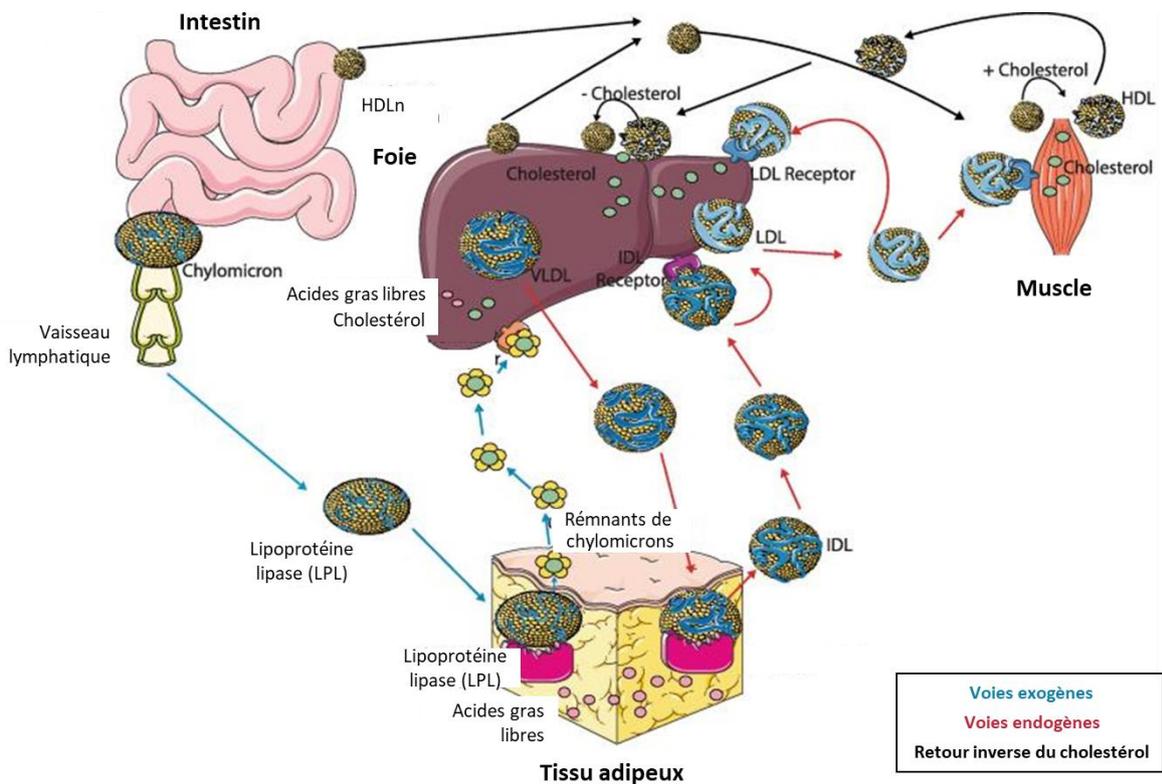


Figure 19 : Schéma des 3 voies du métabolisme du cholestérol

(Adapté de Remmerie et Scott 2018)

5. Excrétion du cholestérol

Il existe deux voies majeures impliquées dans l'élimination du cholestérol, une dépendante des voies biliaires et l'autre non.

a. Voies biliaires

Au niveau des hépatocytes, le cholestérol peut être métabolisé en sels biliaires par une famille d'hydrolases (CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1, ...). Ces sels sont ensuite sécrétés par la pompe BSEP (bile salt export pump) dans les conduits biliaires où ils s'associent en micelles. Parallèlement, le cholestérol peut aussi être sécrété directement vers les voies biliaires par les transporteurs ABCG5 et ABCG8 (L. Yu et al. 2005). Ce cholestérol se lie aux micelles au niveau de leur pôle hydrophobe, et ensemble ils rejoignent la vésicule avant d'être déversés dans l'intestin pour permettre l'absorption des lipides (Kubitzi et al. 2012).

Le cycle entéro-hépatique des voies biliaires est hautement régulé par le récepteur nucléaire FXR (farnesoid X receptor), codé par le gène *Nr1h4*, qui inhibe la synthèse des acides biliaires (Chiang et al. 2000). La flore intestinale participe aussi à ce rétrocontrôle et peut métaboliser le cholestérol en coprostanol, un dérivé très peu absorbé retrouvé en grande majorité dans les fèces (Ramírez-Pérez et al. 2017).

b. Voies non biliaires

L'efflux de cholestérol Trans intestinal ou TICE (transintestinal cholesterol efflux) est un mécanisme au cours duquel le cholestérol des lipoprotéines riches en CE va être excrété dans l'intestin directement sans transformation biliaire (van der Velde et al. 2007). En effet, grâce à l'injection de cholestérol tritié, il a été mis en évidence que les LDL et les HDL contribuaient au TICE. Si le mécanisme d'entrée des HDL n'est pas clairement établi (bien qu'on puisse supposer que SRB1 soit candidat), l'implication du LDLR est bien vérifiée notamment chez des souris *Pcsk9*^{-/-} dans lesquelles le TICE est plus efficace (Le May et al. 2013) Une fois dans l'entérocyte, le cholestérol va pouvoir ressortir au niveau du pôle apical par le transporteur ABCG5/G8 (L. Yu et al. 2002) ou ABCB1a/b (Le May et al. 2013) et être sécrété dans l'intestin (*Figure 20. ④*). Chez l'homme, les premières preuves de ce mécanisme ont été mises en évidence à partir d'échantillon intestinaux (Le May et al. 2013), mais une étude menée sur des volontaires a permis de valider l'existence de ce mécanisme à l'échelle de l'organisme bien qu'il soit moins actif que chez la souris. Chez ces mêmes sujets, l'excrétion de cholestérol était augmentée de 50% sous prise d'ezetimibe (un inhibiteur de l'absorption intestinale de cholestérol au niveau du NPC1L1) (Jakulj et al. 2016). Stimuler le TICE pourrait donc servir de stratégie alternative pour favoriser l'élimination de cholestérol chez des patients à risque cardiovasculaire élevé.

Enfin, il est nécessaire de noter que quel que soit la voie impliquée dans l'élimination du cholestérol, près de la totalité du cholestérol éliminé sous forme d'acides biliaires au niveau intestinal est réabsorbé par le NPC1L1 afin de pallier aux besoins quotidiens en cholestérol (D. Q.-H. Wang et Carey 2003).

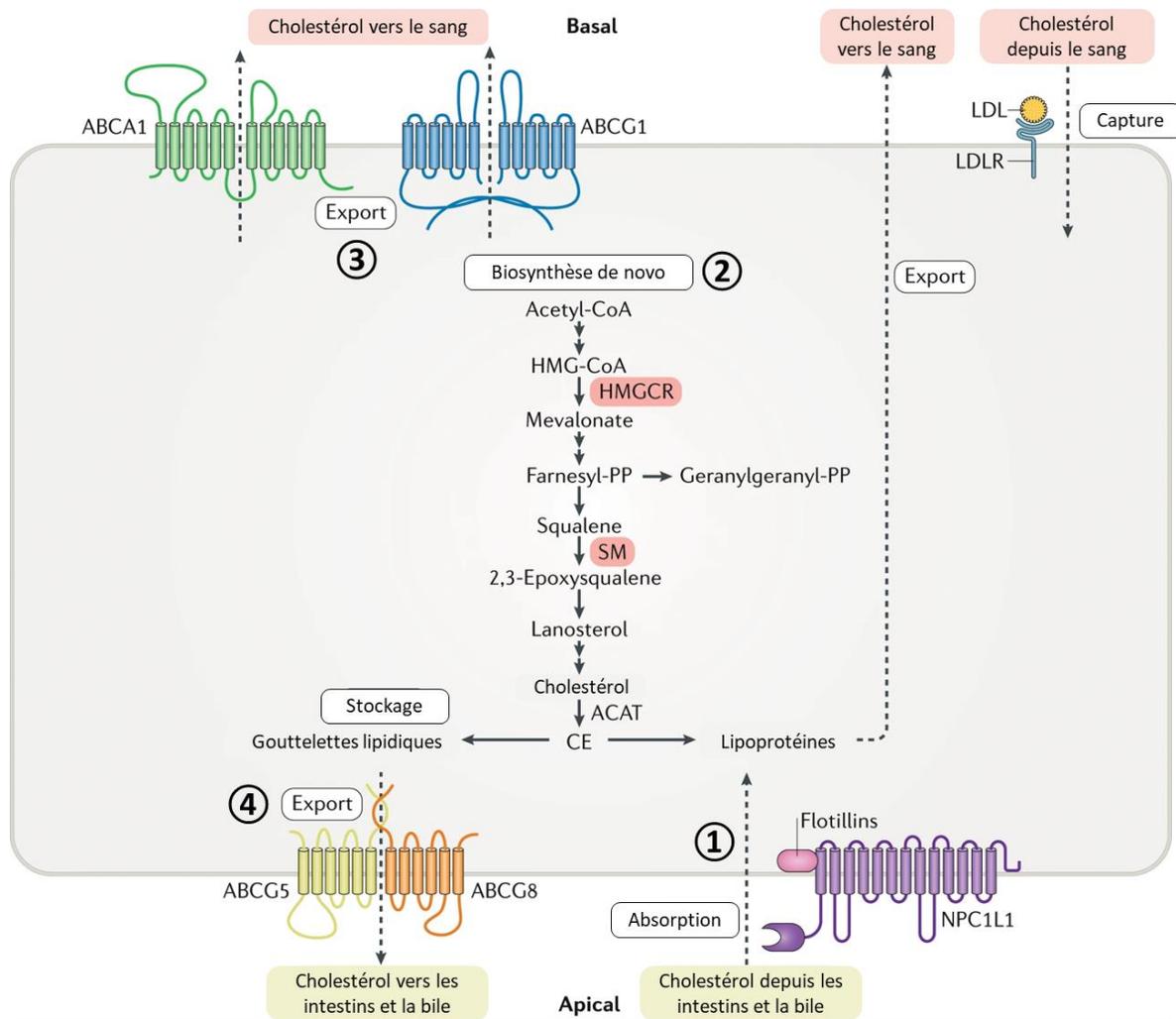


Figure 20 : Voies majeures du métabolisme du cholestérol dans une cellule polarisée telles que les entérocytes et hépatocytes

(Adapté de J. Luo, Yang, et Song 2020)

Partie 3: Les cellules de Kupffer

I. Homéostasie des KCs

1. Ontogénie et localisation des KCs

Parmi les différents organes du corps, le foie est celui qui abrite la population de macrophages la plus nombreuse (Guilliams et al. 2016). En effet, dans un foie sain ils représentent 20 à 25% des cellules non parenchymateuses (Dong et al. 2007; Lopez et al. 2011) et sont majoritairement associés aux ResMacs du tissu, les cellules de Kupffer. Elles doivent leur nom à Karl Wilhelm von Kupffer qui, à la fin du XIXème siècle, les a initialement décrites comme étant des cellules endothéliales (Kupffer 1876). Quelques années plus tard, Browicz les associe plus justement à des macrophages (Browicz 1899) et les travaux de Van Furh permettront ensuite de les inclure dans le système des phagocytes mononucléés (van Furth et al. 1972) dans lequel les macrophages dérivent de monocytes issus de la différenciation d'une CSH. Cependant, ce dogme a été revisité plus récemment, notamment par des études de fate mapping, et il est aujourd'hui clairement établi que les macrophages résidents des tissus ont une ontogénie différente (Epelman, Lavine, et Randolph 2014; Liu et al. 2019) (*Figure 7*). Pour rappel, chez la souris, au moment de l'embryogenèse, les progéniteurs EMP issus du sac vitellin (Gomez Perdiguero et al. 2015) et/ou les CSH (Sheng, Ruedl, et Karjalainen 2015) dérivent en monocytes du foie fœtal (Schulz et al. 2012). Ils se différencient ensuite en KCs sous l'impulsion du facteur de croissance CSF1 qui leur permet aussi de se maintenir indépendamment des monocytes circulants (Hoeffel et al. 2015). Plus récemment, une étape intermédiaire a été proposée dans ce processus de différenciation où l'EMP du sac vitellin y génère un précurseur commun circulant, le pré-macrophage. Celui-ci colonise ensuite les différents tissus par chimiotactisme grâce à l'expression du récepteur CX3CR1. Des régulateurs de transcription contrôlent la différenciation des pré macrophages, menée par le facteur de transcription *Id3* (*transcription factor inhibitor of DNA binding 3*) dans le foie pour le développement des KCs (Mass et al. 2016).

D'autres facteurs sont essentiels à l'identité des KCs, notamment ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox 2) qui régule l'expression du facteur de transcription LXRa

(codé par le gène *Nr1h3*) (Scott et al. 2018). On trouve aussi une surexpression des gènes *SpiC* (Spi-C transcription factor), *Id1* (inhibitor Of DNA Binding 1) et *Irf7* (interferon regulatory factor 7) leur suggérant un rôle clé dans la spécification des macrophages fœtaux en KCs (Mass et al. 2016) (*Figure 21*).

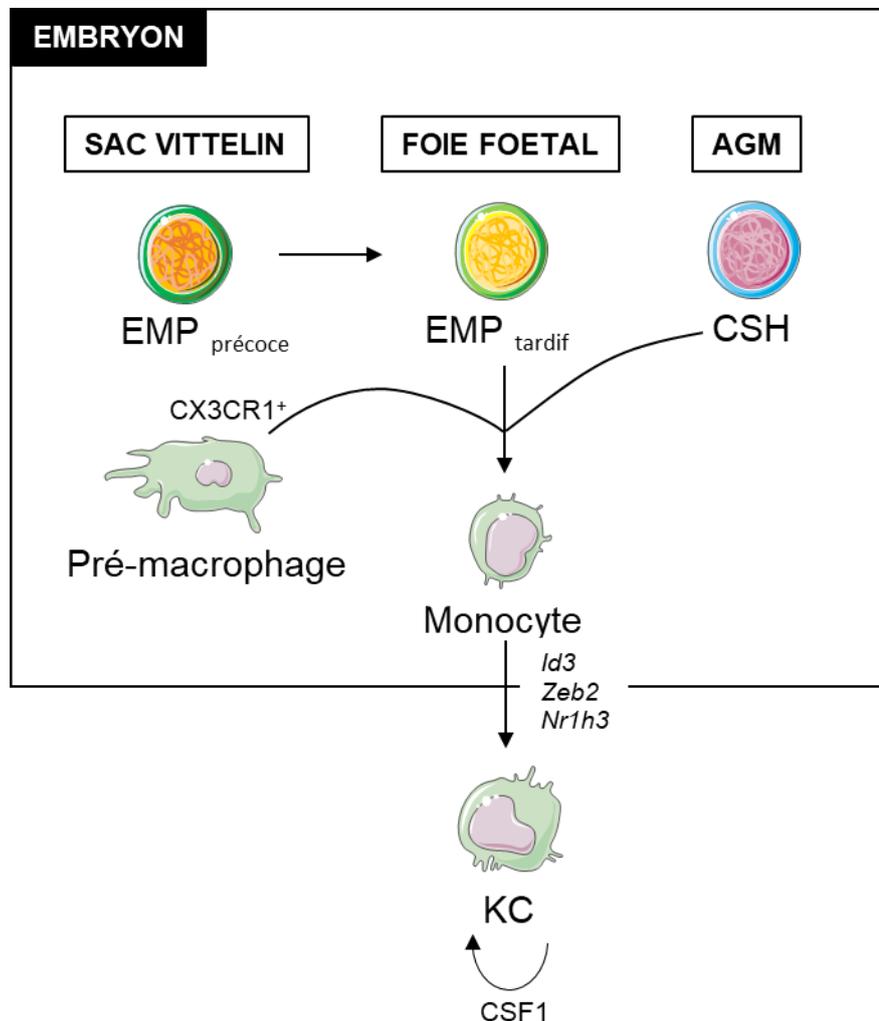


Figure 21 : Ontogénie des KCs au cours de l'embryogenèse chez la souris

Dans le tissu adulte, deux travaux majeurs ont montré l'implication de l'environnement cellulaire, ou niche, dans l'identité des KCs. En effet, la spécificité des KCs est coordonnée par une coopération de signaux provenant des LSECs, des cellules étoilées et des hépatocytes avec lesquels les KCs sont en contacts étroits. Ces cellules expriment les ligands CSF1, DLL4 (delta like canonical notch ligand 4), TGFb, BMP9 et le desmostérol qui vont activer les facteurs de transcription LXRa, SPIC, RBPJ (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region), SMAD et ID3 dans les macrophages initiant ainsi les programmes transcriptomiques essentiels

au développement et au maintien des KCs (Bonnardel et al. 2019; Sakai et al. 2019). Au cours d'une partie suivante, nous associerons les signaux émis aux cellules de la niche qui les ont activés ou induits.

Il est important de noter que les signaux chimiotactiques provenant des LSECs sont produits selon un gradient qui influence la localisation des KCs. On parle de zonation immunitaire hépatique. Elle a été mise en évidence par une étude d'imagerie confocale qui révèle une distribution asymétrique des KCs qui se concentrent dans la zone périportale chez la souris (Gola et al. 2021).

2. Identification des KCs

Au sein des différents tissus de l'organisme, les populations de ResMacs ont des profils de transcription considérablement hétérogènes (Gautier et al. 2012; Lavin et al. 2014) permettant ainsi d'identifier des marqueurs associés. Chez la souris, le gène *Clec4f* (C-Type Lectin Domain Family 4 Member F) est un marqueur spécifique des KCs (Lavin et al. 2014; Scott et al. 2016; Yang et al. 2013). Par cytométrie en flux, elles sont identifiées comme CD45⁺CD11B^{int}F4/80⁺CLEC4F⁺TIM4⁺ (Scott et al. 2016). Cependant, la multitude de publications parues ces toutes dernières années sur les KCs a fait émerger de nouvelles voies d'identification (*Table 2*). Notre équipe a notamment montré que CLEC2 (c-type lectin-like receptor 2), CD207 et VSIG4 (v-set and immunoglobulin domain containing 4) étaient sélectivement ou très fortement exprimés par les KCs (Tran et al. 2020). Aussi, Blériot et al propose une division de la population de KCs, basée sur l'expression de trois marqueurs, en deux sous-groupes. Une population majoritaire appelée KC1 identifiée comme CD206^{low}ESAM⁻CD36⁻ et une seconde KC2 identifiée comme CD206^{hi}ESAM⁺CD36⁺ suggérant ainsi des fonctions métaboliques différentes (Blériot et al. 2021). Cette publication a suscité une polémique au sein de la communauté scientifique et les travaux de Williams et al qui ont suivi ont provoqué une controverse. Considérant que les marqueurs CD206 et ESAM, utilisés par Blériot pour identifier la population de KC2, sont largement exprimés par le LSEC, il suppose que les KC2 ne seraient que des doublets de KC-LSEC. Par plusieurs approches, il retrouve des sous populations de cellules exprimant ces marqueurs mais aussi d'autres marqueurs de LSEC (comme CD26, CD31 et CD38) parmi les populations de KC mais aussi de LB, confirmant ainsi son hypothèse

de doublets de cellules (Guilliams et al. 2022). Tout récemment, Hume et al ont écrit une lettre allant dans le sens des travaux de Guilliams. En utilisant un modèle de souris rapporteur du récepteur *Gpr182* (G protein-coupled receptor 182) (le transcrit le plus enrichi dans les KC2 dans les travaux de Blériot et al.) exprimé spécifiquement par le LSEC, ils n'observent aucun co-marquage avec la protéine F4/80, marqueur spécifique des macrophages et des KCs (Hume, Offermanns, et Bonnavion 2022). En réponse, l'équipe de Ginhoux dans laquelle Blériot travaille, écrit aussi une lettre vindicative. Ils y montrent par imagerie 3D un marquage F4/80⁺ et un co-marquage F4/80⁺CD206⁺ qui, de plus, respecteraient selon eux les proportions de KC1/KC2 décrites par Blériot et al dans sa publication initiale.

Notons que les approches bio-informatiques d'identification des populations par Guilliams ont leur lot de limitations (pouvoir de résolution, « batch effect », utilisation de transcrits et pas de protéine). Enfin alors qu'Hume et Ginhoux ne proposent qu'un champs 3D pour argumenter leur propos respectif, celui de Hume ne permet pas de distinguer les KC1 des KC2 et on pourrait supposer que la cellule observée n'est en fait qu'une KC1. Celui de Ginhoux permet de différencier les KC1 des KC2 sans proposer une image des LSECs seules. Des modèles de fate-mapping permettant de suivre les KC1 des supposées KC2 aideraient à clarifier cette discussion. Le débat reste donc ouvert...

Alors que l'absence de modèles de fate mapping chez l'humain ne permet pas d'identifier clairement l'ontogénie des KCs chez l'homme, le perfectionnement des techniques de transcriptomique et protéomique sur cellule unique a permis de réaliser des avancées majeures en ce qui concerne l'analyse à haute résolution de la composition cellulaire et notre compréhension de multiples pathologies. Ainsi, de nombreuses méthodes de séquençage d'ARN sur cellule unique (scRNAseq) ont été développées pour étudier le tissu hépatique, identifier les différentes populations et sous populations ; ce qui n'avait jusque-là pas été possible avec les techniques traditionnelles de cytométrie en flux et d'immunofluorescence (*Table 2*). Des scRNAseq réalisées sur des foies humains par trois différents groupes ont permis de caractériser les KCs humains comme des macrophages CD163⁺MARCO⁺CD68⁺CD5L⁺VSIG4⁺HMOX⁺TIMD4⁺ (Aizarani et al. 2019; MacParland et al. 2018; P Ramachandran et al. 2019), similaires aux KCs d'origine embryonnaire décrites chez la souris. Par l'identification de ces marqueurs, la

distribution spatiale des KCs a été identifiée, notamment pour les cellules MARCO⁺ largement localisées dans les aires périportales (MacParland et al. 2018). Cependant, dans cette étude, le nombre d'échantillons est faible et les résultats de localisation basés sur des analyses bio-informatiques. Une étude comparative de la localisation spatiale des cellules hépatiques chez différentes espèces témoigne, sur plus d'échantillons et par imagerie, d'une localisation différente chez l'homme. Si elle confirme les données observées chez la souris par Gola, où les KCs sont localisées en zone périportale, les KCs humaines seraient localisées entre les zones périportales et centrale, c'est ce qu'on appelle la « mid zone » (Guilliams et al. 2022).

Il a aussi été mis en évidence que l'activité du facteur de transcription *Nr1h3* était augmentée dans les KCs humains (P Ramachandran et al. 2019) renforçant les ressemblances avec les KCs murines, où ce facteur de transcription est impliqué dans leur différenciation et leur maintenance (Bonnardel et al. 2019; Sakai et al. 2019).

L'étude de MacParland a aussi identifiée une autre population de macrophages. Elles sont CD68⁺MARCO⁻ et ont une signature génique caractéristique des macrophages recrutés MoDMacs, suggérant que cette population dérive des monocytes (MacParland et al. 2018). Elles sont décrites comme étant plus inflammatoires que les CD68⁺MARCO⁺ mais moins que les monocytes CD16⁺ circulants (MacParland et al. 2018). Ces données supposent qu'une fois entré dans le foie, le monocyte s'adapte à un environnement immunotolérant et limite son activation inflammatoire. En comparaison, la souris ne présente quasi pas de MoDMacs en condition homéostatique (5% en moyenne). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'homme soit constamment exposé aux germes environnants alors que les modèles de souris évoluent dans des contextes aseptisés.

Souris	Homme
CD45 ⁺	CD68 ⁺
CD11b ^{int}	CD163 ⁺
CD68 ⁺	MARCO ⁺
CD64 ⁺	CD5L ⁺
F4/80 ⁺	VSIG4 ⁺
CLEC1b (CLEC2) ⁺	TIM4 ⁺
CLEC4F ⁺	NR1H3 ⁺
CD207 ⁺	HMOX ⁺
VSIG4 ⁺	
TIM4 ⁺	
NR1H3 ⁺	
LY6C ⁻	

Table 2 : Marqueurs d'identification des KCs chez la souris et l'homme

Enfin, il est intéressant de noter que les KCs semblent avoir évolué de façon similaire au sein de multiples espèces. En effet, par scRNAseq, Williams a identifié un programme transcriptionnel hautement conservé entre l'homme la souris, le hamster, le macaque, le porc, le poulet et le zebra fish (Williams et al. 2022).

Bien que ces différentes études soient critiquables (critères de sélection des échantillons ; nombre d'échantillons ; limitations des techniques d'analyses), ces données ouvrent la voie à une compréhension plus poussée de la physiologie et la physiopathologie des KCs.

3. Fonctions

Il est établi, depuis de nombreuses années, que les ResMacs du foie ont des rôles cruciaux dans le maintien de l'homéostasie hépatique ainsi que l'équilibre de l'organisme entier.

a. Maintien d'une tolérance immunitaire et détoxification du sang

Le foie reçoit le sang provenant de la veine porte et de l'artère hépatique. Sa microarchitecture spécifique entraîne un flux sanguin assez lent dans les sinusoides où sont localisés les KCs. Cette position stratégique, près de la veine porte chez la souris, leur permet d'éliminer du sang les endotoxines bactériennes, notamment grâce au récepteur du complément VSIG4 (Z. Luo et al. 2021; Zeng et al. 2016), et les produits microbiens provenant du tractus intestinal. Les travaux de Gola montrent d'ailleurs une localisation diffuse des KCs chez des souris germ-free et une dissémination bactérienne importante chez des souris pour qui la localisation des KCs est perturbée (Gola et al. 2021).

Parce qu'elles y sont constamment exposées et que l'objectif est de maintenir l'homéostasie du tissu, les KCs jouent un rôle essentiel dans le maintien d'une tolérance immunitaire et d'un microenvironnement anti-inflammatoire. Pour cela, elles produisent la cytokine anti-inflammatoire IL10 (Heymann et al. 2015; Knolle et al. 1995) et induisent l'expansion et l'activation des LTreg (Heymann et al. 2015).

De plus, les KCs expriment plusieurs récepteurs Fc et récepteur éboueurs (TIM4, MerTK, ...) à leur surface qui leur permettent de reconnaître des molécules modifiées entraînant l'élimination de cellules apoptotiques, de débris cellulaires et de complexes immuns (Jenne et Kubes 2013).

Enfin, les KCs peuvent aussi, grâce à leurs PRRs, reconnaître et éliminer les pathogènes étrangers. On trouve à leur surface des récepteurs de type TLR (Nakamoto et Kanai 2014), NOD-like (Kanneganti, Lamkanfi, et Núñez 2007) et RIG-I-like (Terpstra et van Berkel 2000). Cela pourrait suggérer un rôle des KCs dans la réponse aux pathogènes. Il a d'ailleurs été montré que la perte d'expression des TLR2 et 3 présents à la surface des KCs aggravait la stéatose alcoolique chez la souris (P. Luo et al. 2019).

b. Elimination des plaquettes sénescents

Les KCs sont impliquées dans l'élimination des plaquettes sénescents. Ce mécanisme est classiquement réalisé par la lectine MGL (macrophage galactose-type lectin) (Deppermann et al. 2020). De plus, lorsque les plaquettes sont désialylées, c'est-à-dire qu'elles perdent les acides sialiques qui les protègent à leur surface, les résidus β -galactose sont exposés et sont reconnus par la lectine CLEC4F qui favorise leur endocytose (Jiang et al. 2021). D'ailleurs, dans certaines formes de thrombopénies, on retrouve une suractivité des sialidases, les enzymes impliquées dans cette désialylation. Enfin, les plaquettes interagissent avec les bactéries dans le sang et favorisent ainsi leur élimination par les KCs (Wong et al. 2013).

c. Implication dans le métabolisme du fer et des globules rouges

Les KCs sont aussi fortement impliquées dans le maintien de l'équilibre métabolique du fer (Gammella et al. 2014; M. Theurl et al. 2008).

Le fer présent dans les globules rouges sénescents (RBCs) doit être recyclé efficacement. Si les hépatocytes représentent la population cellulaire qui stocke le plus de fer, ils ne sont pas équipés pour phagocyter les RBCs contrairement aux KCs. En effet, on retrouve à leur surface des récepteurs scavengers comme SRA1, MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) ou CD36 qui prennent en charge les RBCs. Aussi, les KCs expriment des gènes qui leur permettent de capter, métaboliser et exporter le fer afin de le recycler. Les récepteurs CD91 et CD163 sont impliqués dans l'import de complexes associés à l'hème, quand le CD71 et le DMT1 (divalent metal transporter 1) font entrer du fer libre ou associé à une protéine de transfert (Kristiansen et al. 2001; Scott et Williams 2018; Terpstra et van Berkel 2000; Willekens et al. 2005). Dans la cellule, les complexes hème-fer vont être dissociés par HMOX (heme oxygenase 1) et le fer va pouvoir être stocké sous forme complexé avec la ferritine ou exporté par le transporteur FPN1 (ferroportine-1) vers l'hépatocyte (Hentze et al. 2010). La FPN1 étant l'unique transporteur de fer identifié chez les mammifères, son activité est finement régulée. Ainsi, en réponse à un excès de fer circulant, l'hépatocyte synthétise une hormone peptidique, l'hepcidine qui inhibe la FPN1 en entraînant sa dégradation (Delaby et al. 2005).

Cet équilibre homéostatique est contrôlé par les facteurs de transcription SPIC et NRF2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) très exprimés par les KCs (Bonnardel et al. 2019; Scott et Williams 2018; I. Theurl et al. 2016).

d. Métabolisme des lipides

L'implication des KCs dans le métabolisme lipidique a été suggéré. En effet, il a été montré chez l'homme et dans des modèles de souris transgéniques humanisées, que la CETP serait majoritairement exprimée par les KCs (Yanan Wang et al. 2015). Pour rappel, cette protéine sécrétée se retrouve dans le compartiment intravasculaire et participe au métabolisme lipoprotéique en permettant l'échange équimolaire de CE et de TG entre les HDL et les lipoprotéines contenant de l'APOB100 telles que les VLDL et les LDL.

De plus, le profil génique des KCs est enrichi en gènes impliqués dans l'import et l'export de lipides. Ce trafic est fortement contrôlé par le facteur de transcription LXRA, qui jauge le cholestérol cellulaire et qui est décrit comme essentiel au maintien des KCs (Bonnardel et al. 2019; Scott et al. 2018; Scott et Williams 2018). Enfin, une récente étude a suggéré l'existence d'une sous population minoritaire de KCs, appelée KC2 (voir la section « Identification des KCs ») avec une signature métabolique spécifique et qui pourrait être impliquée dans l'homéostasie du glucose, le stress oxydatif et dans le métabolisme des lipides grâce à l'expression du récepteur CD36. En effet, dans un contexte d'obésité et de stéatose hépatique, l'ablation de cette sous population cellulaire ou la déficience de *Cd36* sur ces cellules prévenaient le développement de la maladie (Blériot et al. 2021, 36).

4. Modèles d'étude des KCs

Il a longtemps été impossible d'étudier une population de ResMacs sans impacter une bonne partie du système des phagocytes mononucléés, notamment via l'injection de chlorure Gadolinium ou de liposomes de clodronate permettant d'éliminer ces phagocytes (Bouchareychas et al. 2015; Fisher et al. 2013) ou encore l'utilisation de modèles transgéniques aspécifiques comme *Lysm-cre* (ciblant les macrophages, les neutrophiles et une partie des DCs) ou le CD68 (ciblant les monocytes et les macrophages). Aujourd'hui, grâce à l'identification des marqueurs spécifiques et les

outils génétiques à disposition, plusieurs modèles de souris permettant de cibler les KCs ont été générés (*Table 3*).

Nom du modèle	Objectif	Localisation	Symbole	Publications associées
Lang-DTR EGFP ou CD207-DTR	Déplétion des cellules CD207 ⁺ par injection de toxine dyptérique	Jackson Laboratory	B6.129S2-Cd207 ^{tm3(DTR/GFP)Mal/J}	Kissenpfennig A , et al. 2005 Tran et al. 2020
CD207 Cre	Délétion d'un gène dans les cellules CD207 ⁺	Björn E. Clausen lab	Langerin-Cre mice	Zahner et al. 2011 Tran et al. 2020
Clec4f-DTR	Déplétion des KCs par injection de toxine dyptérique	Martin Guillems Lab	B6-Clec4f ^{tm1Ciphe}	Scott CL, et al. 2016 Bonnardel et al. 2019
Clec4f Cre	Délétion d'un gène dans les KCs	Martin Guillems Lab	B6-Clec4f ^{tm3Ciphe}	Scott CL, et al. 2018 Bonnardel et al. 2019 Cohen et al. 2021
Clec4f Cre	Délétion d'un gène dans les KCs	Jackson Laboratory	C57BL/6J-Clec4f ^{em1(cre)Glass/J}	Sakai M , et al. 2019

Table 3 : Modèles d'études des KCs chez la souris

II. KCs et pathologies

1. Diversités des KCs

En condition d'homéostasie, les monocytes circulent dans les sinusoides hépatiques et ne contribuent qu'à une infime proportion de la population des KCs (Beattie et al. 2016; Scott et al. 2016).

Toutefois, il a été démontré que l'injection de toxine diphtérique (DT) dans le modèle *Clec4f-DTR* de déplétion des KCs (Bonnardel et al. 2019; Scott et al. 2016), ou bien que l'irradiation des souris (Beattie et al. 2016), conduit à la perte des KCs dans le foie des souris et à la génération rapide et massive de KCs dérivées des monocytes. On les appelle MoKCs en opposition aux EmKCs établies lors de l'embryogénèse. Si après irradiation on observe une inflammation légère et transitoire marquée par l'augmentation des ALT (alanine aminotransferase) dans le plasma des souris irradiées, c'est dans le contexte de déplétion à la DT que les mécanismes à l'origine de la mort des EmKCs et de l'implantation des MoKCs ont été mis en évidence. En effet, après l'injection de DT, les EmKCs activent des voies inflammatoires ou de stress oxydatifs qui mènent à leur apoptose et à la production de cytokines telles que IL1a et TNFa (Bonnardel et al. 2019). Ce processus initie la collaboration des différentes

cellules de la niche avec notamment les cellules endothéliales qui secrètent la chimiokine CCL2 et expriment à leur surface des molécules d'adhésion, comme VCAM1 et SEL-E pour, permettre le recrutement des monocytes LY6C⁺ (Bonnardel et al. 2019). Dans les sinusoides, le monocyte perd l'expression du LY6C (Prakash Ramachandran et al. 2012) et se différencie en macrophages. Grâce à l'environnement cellulaire, il y acquiert un programme génétique spécifique des KCs. La protéine DLL4 à la surface des LSECs et le TGFb produit par les HSC induisent l'activation synergique des voies Notch et BMP dans le futur KC, ce qui entraîne l'activation du facteur de transcription LXRa. De leur côté, les hépatocytes induisent l'expression du facteur de transcription ID3 et sécrètent du desmostérol qui participerait (reste à démontrer *in-vivo*) à réguler l'expression de LXRa et par extension l'identité des KCs. Enfin, les sécrétions de CSF1 par les LSECs et les HSC ainsi que d'IL34 par les HSC permettent la prolifération des nouveaux KCs et leur maintien dans le tissu sans la contribution de monocytes circulants (Bonnardel et al. 2019; Sakai et al. 2019) (Figure 22).

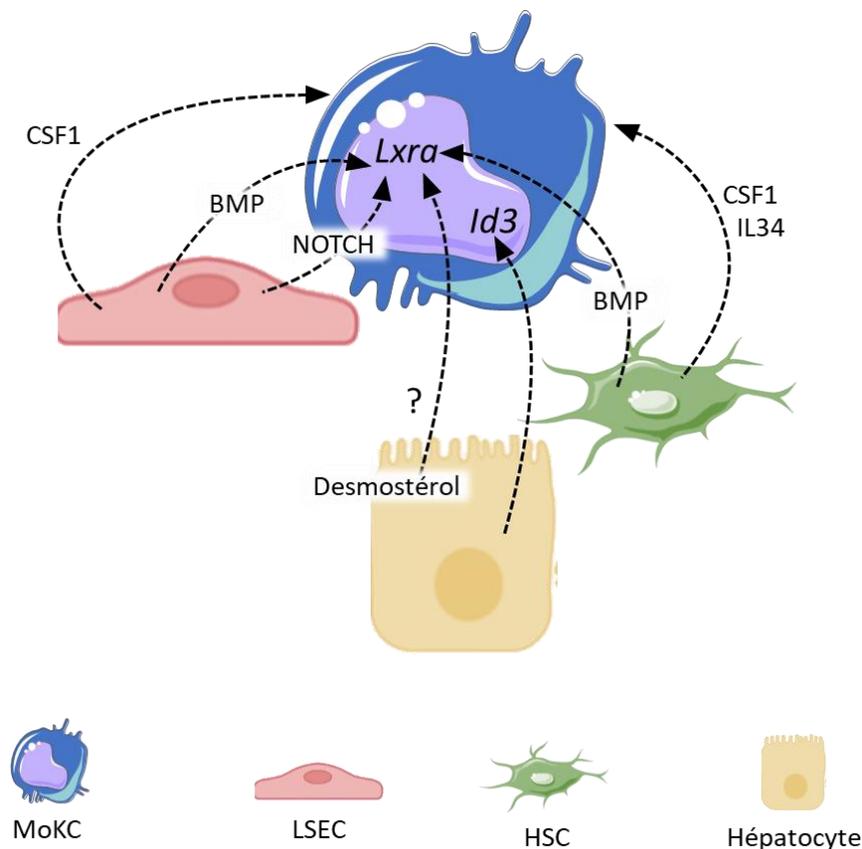


Figure 22 : Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la génération de MoKCs

D'autre part et en dépit des fortes similarités entre les EmKCs et les MoKCs, notamment avec l'expression des marqueurs macrophagiques CD64 et F4/80 ainsi que du marqueur spécifique des KCs CLEC1B (Tran et al. 2020), il existe des différences subtiles entre les profils d'expression géniques de ces deux populations. Particulièrement, le gène *Tim4* (T cell immunoglobulin and mucin domain containing 4), marqueur désigné pour distinguer les EmKCs des MoKCs qui ne l'expriment pas lorsqu'elles sont recrutées (Scott et al. 2016; Tran et al. 2020) (Table 4).

emKC	moKC
CD45 ⁺	CD45 ⁺
CD11b ^{int}	CD11b ^{int}
CD64 ⁺	CD64 ⁺
F4/80 ⁺	F4/80 ⁺
CLEC1b (CLEC2) ⁺	CLEC1b (CLEC2) ⁺
CLEC4F ⁺	CLEC4F ^{+/-}
VSIG4 ⁺	VSIG4 ^{+/-}
TIM4 ⁺	TIM4 ⁻

Table 4 : Comparaison des marqueurs d'identification entre les EmKCs et les MoKCs chez la souris

Ces différences phénotypiques ont suggéré des différences fonctionnelles révélées notamment grâce à des expériences de phagocytose bactérienne. Dans une première étude, menée sur des souris dont les EmKCs ont été déplétées après injection au clodronate, les auteurs ont mis en évidence une phagocytose plus faible par les MoKCs générés dans le foie des souris (David et al. 2016). Dans une seconde étude de déplétion plus spécifique des EmKCs après injection à la DT, les auteurs ont mis en évidence une différence de phagocytose, entre les deux populations de KCs, sans toutefois être significative (Scott et al. 2016). Notons qu'ici, l'expérience est réalisée in vitro sur des cellules triées et que les MoKCs étaient établis dans le foie des souris sur des temps plus long que dans l'étude de David et al. Cette hypothèse pourrait suggérer que les MoKCs puissent acquérir progressivement un phénotype plus proche des EmKCs.

En effet, c'est ce qui est montré dans plusieurs études où le profil génique (Scott et al. 2016), le phénotype (Tran et al. 2020) et la fonction (David et al. 2016) des MoKCs se rapprochent de ceux des EmKCs avec le temps sans toutefois qu'il soit établi si les MoKCs peuvent atteindre toutes les caractéristiques et fonctions des EmKCs ou bien si l'ontogénie de la cellule conditionne sa fonction.

De façon similaire, dans les poumons de souris, on retrouve des macrophages alvéolaires dérivés des monocytes (moAM) à la suite d'une infection virale. Comparés aux macrophages résidents initialement dans le tissu (resAM), ces moAMs présentaient des modifications épigénétiques suggérant des différences fonctionnelles. Il est cependant nécessaire de noter qu'avec le temps, les moAMs ressemblaient davantage aux resAMs et pourraient acquérir des fonction similaires (Aegerter et al. 2020).

En parallèle, une étude a montré dans un contexte de lésion stérile, que les macrophages péritonéaux F4/80+ GATA6+ pouvaient infiltrer le foie (J. Wang et Kubes 2016). Ces données sont aujourd'hui controversées par une autre étude démontrant que des macrophages péritonéaux pouvaient s'accumuler à la surface du foie sans toutefois entrer dans le tissu hépatique (Jin et al. 2021). Ensemble, ces résultats suggèrent que la composition des macrophages hépatiques est complexe et que les macrophages recrutés peuvent l'être de sources différentes bien que la population des MoKCs soit celle qui est la plus étudiée aujourd'hui.

2. Réponses et implications des KCs en conditions physiopathologiques

a. KCs et lésions hépatiques aiguës

i. Présentation de l'ALI

La lésion hépatique aiguë ou ALI (acute liver injury) représente les différents stades de sévérité d'une détérioration soudaine des fonctions hépatiques sans lien avec une maladie chronique sous-jacente. L'ALI est associée à une morbidité et une mortalité élevée sans traitements adéquats. Chaque année aux US, 44 000 individus développent une ALI due à une surconsommation médicamenteuse (Bell et Chalasani 2009). L'insuffisance hépatique aiguë ou ALF (acute liver failure) est une forme d'ALI

caractérisée par une diminution potentiellement mortelle de la fonction hépatique due à des dommages majeurs au niveau des hépatocytes (Krenkel et Tacke 2017). Dans la plupart des pays occidentaux, la prise de doses toxiques d'acétaminophène (paracétamol) est la cause principale d'ALF, tandis que les infections virales, comme l'hépatite A, B ou E, prédominent dans les pays en développement (Bernal et Wendon 2013). A ce jour, la transplantation hépatique reste le seul traitement proposé en cas d'ALF sévère, rendant nécessaire une meilleure compréhension de la biologie des ALI pour développer des thérapeutiques adaptées.

Au cours de l'ALI, la nécrose hépatocytaire initiale est due à un stress oxydatif durant lequel la présence de ROS entraîne une dysfonction mitochondriale qui conduit au relargage de DAMPs (Bernal et Wendon 2013). Ces DAMPs, comme le HMGB1 (high mobility group box 1) et l'ADN mitochondrial se lient aux PRRs et TLRs de cellules telles que les macrophages (Roohani et Tacke 2021; Triantafyllou et al. 2018). De nombreux modèles ont été développés afin d'identifier les réponses moléculaires et cellulaires à une ALI. On retrouve l'induction d'une destruction ou d'une nécrose hépatocytaire par injection de concanavalin A (Erhardt et al. 2007), ou de tétrachlorure (Bernal et Wendon 2013) respectivement, des infections bactérienne (Chung et al. 2012) virale (Movita et al. 2015), ou des overdoses médicamenteuses (Mossanen et al. 2016; You et al. 2013; Zigmond et al. 2014).

ii. L'ALI par surconsommation médicamenteuse

L'induction d'une ALI par injection d'acétaminophène (APAP) est sûrement le modèle d'ALF le mieux décrit. Les KCs répondent au dommage tissulaire par une production rapide de cytokines comme l'IL1b et le TNF α et de chimiokines comme le CCL2 et le CCL5 (Heymann et Tacke 2016). Le nombre de KCs est réduit après seulement 24h et un nombre important de monocytes LY6C⁺ infiltrent le foie (Coelho et al. 2020; Zigmond et al. 2014) et se différencient en MoDMacs qui produisent à leur tour des agents pro-inflammatoires, participant ainsi au développement de la lésion. Il a d'ailleurs été montré que la lésion était diminuée dans des modèles génétiques où le recrutement de monocytes était bloqué (Choi et al. 2015; Mossanen et al. 2016). Des résultats similaires ont été retrouvés chez des patients après une overdose de paracétamol, avec une accumulation de macrophages CCR2⁺ en zone périportale

(Mossanen et al. 2016) et une augmentation de CCL2 dans le plasma (Antoniades et al. 2012). Cependant, l'idée selon laquelle les MoDMacs auraient un rôle délétère a été remis en cause dans ces mêmes modèles de blocage de recrutement monocytaire, où la phase de réparation du tissu était étendue (Holt, Cheng, et Ju 2008; Zigmond et al. 2014). Ces données suggèrent ainsi l'importance de ces MoDMacs dans la résolution de la maladie, notamment car ils passent à un phénotype anti-inflammatoire (Bourdi et al. 2002, 2007; Yee et al. 2007; Zigmond et al. 2014). Cependant, une plus récente étude a montré qu'en phase de résolution, le nombre de KCs augmentait sous le contrôle du récepteur *Trem2*, ce qui pourrait suggérer que les MoDMacs ou une partie d'entre eux seraient des MoKCs (Coelho et al. 2020).

Toutefois, l'absence de marqueurs spécifiques distinguant les différentes populations de KCs, entre elles et au sein des autres populations de macrophages, ne permet pas de mettre clairement en évidence le rôle des KCs au cours de l'ALI. Récemment, *Clec2* a été proposé comme un marqueur précoce des KCs (Tran et al. 2020) et pourrait servir à l'identification de MoKCs dans des contextes de pathologies aiguës.

En plus de l'insuffisance hépatique, les patients ALF sont susceptibles de développer des infections bactériennes et un sepsis. En ce sens, dans des modèles de souris APAP et injectées en intraveineuse par *E. coli*, on observe une élimination fortement réduite de la bactérie par les KCs conduisant à une dissémination systémique de celle-ci. Durant la phase de réparation, les KCs activent un programme de mort cellulaire de type PD-1 (programmed cell death protein 1) dont le blocage favorise l'élimination bactérienne par les KCs et protège les souris d'un sepsis. L'immunothérapie anti-PD-1 pourrait donc être envisagée afin de réduire le développement de sepsis chez des patients ALF due à une APAP (Triantafyllou et al. 2021).

Il est important de noter que lorsqu'un sepsis se déclenche, l'équilibre érythrocytaire est modifié, l'hémoglobine et l'hème se détachent ce qui conduit à une hémolyse intravasculaire. Dans ce contexte, Theurl a montré chez la souris une diminution du nombre de KCs concomitante à l'arrivée massive de monocytes Ly6C⁺ et à l'établissement transitoire de macrophages FPN1⁺ TIM4⁺, assimilés à des MoKCs. Ces MoKCs localisées près des EmKCs, dépendent du CSF1 et NRF2 et participent à l'ingestion des RBCs et au recyclage du fer, un des rôles clés des KCs. L'inhibition du recrutement monocytaire au niveau du foie, conduit à des dommages hépatiques et rénaux (I. Theurl et al. 2016). Ainsi, comprendre les mécanismes mis en jeu par les

MoKCs permettrait de traiter les patients avec une élimination des globules rouges perturbée par le sepsis.

iii. L'ALI par infection virale

Le rôle des macrophages hépatiques dans l'ALI virale a été un peu exploré. Il a notamment été démontré que lors d'une infection par l'hépatite B, le nombre de KCs diminuait suivi d'un recrutement massif et rapide de monocytes LY6C⁺ dont certains se différenciaient en MoDMacs. Dans ce même contexte, bloquer le recrutement des monocytes par injection d'un antagoniste de CCR2 ralentissait l'élimination du virus, alors que dépléter les KCs au clodronate favorisait une entrée encore plus massive de monocytes, ce qui contribuait à une élimination accélérée du virus. Ainsi, les populations de macrophages hépatiques pourraient réguler différemment l'élimination du virus. Il semble important de noter que la méthode de déplétion utilisée dans cette étude n'est pas spécifique aux KCs (Wu et al. 2019).

Lors d'une infection virale chez l'homme, le nombre de macrophages hépatiques est augmenté et est à l'origine de l'infiltration d'autres cellules immunitaires par la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1b, l'IL18 ou le TNFa. Comparativement, des expériences menées sur des cultures primaires de KCs de souris infectées à l'hépatite C suggèrent qu'elles produisent de l'IL6 et de l'INFg ce qui pourrait induire l'apoptose des hépatocytes infectés. Toutefois, les méthodes d'isolation des KCs et de mise en culture ne permettent pas de considérer ces données comme solides (Broering et al. 2008).

L'infection virale peut dans certains cas subsister dans le temps et s'établir de manière chronique. La réponse immunitaire est déficiente et on retrouve un taux plasmatique d'IL10 augmenté chez l'homme et la souris, une diminution d'IL12 et un épuisement des LT résultant de la signalisation TLR2 dans les KCs. Ce contexte et l'excès d'antigène pourraient contribuer à l'échappement de la protéine virale aux réponses immunitaires mises en jeu pour la combattre.

b. KCs et lésions hépatiques chroniques

La lésion hépatique chronique ou CLD (chronic liver disease) est caractérisée par un déclin des fonctions hépatiques résultant d'un processus de destruction continue et de régénération du parenchyme en un tissu fibrotique pouvant aller jusqu'au stade cirrrose et conduire au développement d'un hépatocarcinome (HCC).

L'étiologie de la CLD est assez large et inclue les évolutions cliniques de la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) à savoir la stéato-hépatite non alcoolique ou NASH (Non-Alcoholic SteatoHepatitis) et la cirrrose, la stéatose alcoolique ou ALD (alcoholic liver diseases) et les infections virales chroniques. La progression de la maladie est alimentée par une inflammation hépatique où les macrophages jouent un rôle essentiel dans le contrôle de cette inflammation au cours d'une CLD.

Parmi les différentes causes de CLD, le rôle des KCs n'a été à ce jour étudié qu'au cours de la NASH et certaines de ses évolutions.

i. NASH

La NAFLD est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique et dont la prévalence est estimée à 25% au sein de la population adulte mondiale (Younossi et al. 2016). Son incidence est en constante augmentation et on prévoit qu'en 2030 la NAFLD touche 300 millions de personnes en Chine, 100 millions aux US et 15-20 millions en Europe (Estes et al. 2018), ce qui en fait un problème majeur de santé publique. Elle est caractérisée par une stéatose, l'accumulation de TG dans les hépatocytes, due à une lipogenèse *de novo* alimentée par un apport trop important en glucose et en acides gras libres.

La transition vers la NASH est déterminée par l'association de multiples stress cellulaires dans les hépatocytes gorgés de lipides, incluant le stress du RE, des dommages mitochondriaux, un stress oxydatif avec production de ROS et une lipotoxicité. Ces stress sont causés par l'accumulation d'acides gras saturés, de cholestérol dans le RE et d'une lipogenèse *de novo* engendrée par la prise de fructose (Softic, Cohen, et Kahn 2016). De plus, cet apport en fructose accroît la perméabilité intestinale, ce qui favorise l'entrée de pathogènes et leurs dérivés et active les cellules immunitaires du foie. Tout cela conduit à une inflammation hépatique, la mort des

hépatocytes stressés qui relarguent des médiateurs pro-inflammatoires conduisant au développement de la fibrose.

La multitude d'études réalisées sur des modèles de NASH ainsi que les récentes avancées en transcriptomique ont permis de mieux comprendre la réorganisation du système immunitaire hépatique au cours de la NASH chez la souris (Remmerie et al. 2020) mais aussi dans le foie cirrhotique chez l'homme (P Ramachandran et al. 2019). Ce remodelage concerne une grande variété de populations cellulaires immunitaires (monocytes, neutrophiles, cDC1, LB et LT CD4, ...) qui participent à la mise en place d'un environnement inflammatoire incontrôlé et à la progression de la maladie (Huby et Gautier 2021).

On observe notamment un recrutement important de monocytes circulants qui se différencient en MoDMacs, augmentant ainsi le nombre de macrophages dans le foie (Krenkel et Tacke 2017). De récentes études ont fait la lumière sur la diversité des macrophages hépatiques dans des modèles de NASH chez la souris (Devisscher et al. 2017; Remmerie et al. 2020; Seidman et al. 2020; Tran et al. 2020).

Une des données majeures est l'identification de KCs TIM4⁻ dans les foies malades (Remmerie et al. 2020; Seidman et al. 2020; Tran et al. 2020) témoignant d'une perturbation de la maintenance des EmKCs et qu'une partie des monocytes recrutés se différencient en MoKCs. Des modèles de fate mapping ont validé cette donnée (Tran et al. 2020) et grâce à de l'imagerie il a été montré que ces MoKCs étaient localisées au niveau des sinusoides hépatiques, tout comme les EmKCs (Remmerie et al. 2020; Seidman et al. 2020). Des analyses transcriptomiques ont mis en évidence une augmentation des gènes associés à la lipotoxicité dans les EmKCs. Cette signature de stress cellulaire explique selon toute vraisemblance l'origine de la mort des EmKCs, remplacées par les MoKCs afin de maintenir la population de KCs au sein de la niche (Tran et al. 2020). De leur côté, ces MoKCs expriment moins fortement les marqueurs CLEC4F et VSIG4, témoins de leur différenciation incomplète, et diffèrent de leurs congénères embryonnaires par un profil transcriptomique plus inflammatoire et une fonctionnalité altérée (Tran et al. 2020). En effet, les travaux de l'équipe ont mis en évidence que les MoKCs limitaient le stockage hépatique de TG mais favorisaient les lésions tissulaires (Tran et al. 2020). Ainsi, l'homéostasie des KCs est fortement perturbée au cours de la NASH et a un impact sur la pathologie.

A ce jour, dans le contexte de la NASH, il n'y a pas d'évidence de la présence de MoKCs chez l'homme, mais on observe toutefois une population de MoDMacs pro-fibrotiques identifiée comme TREM2⁺CD9⁺ (P Ramachandran et al. 2019), des marqueurs que l'on retrouve dans les MoDMacs (Remmerie et al. 2020; Seidman et al. 2020; Xiong et al. 2019) et MoKCs murins (Tran et al. 2020). Remarquons que *Trem2* est aussi un marqueur des LAM (lipid-associated macrophages) du tissu adipeux dans un contexte d'obésité (Jaitin et al. 2019), suggérant que les réponses seraient conservées au sein des tissus et entre les espèces.

ii. Fibrose et hépatocarcinome

Quelle que soit la cause initiatrice de la maladie, la répétition de lésions conduit à la déposition de MEC et à la mise en place d'une fibrose progressive. Le degré de la fibrose permet d'ailleurs de prédire les évolutions cliniques telles qu'une aggravation de la maladie, le développement d'un cancer du foie ou la mort (Angulo et al. 2015). Et puisque les possibilités de greffe sont rares, il est donc d'un intérêt majeur de développer des thérapies anti-fibrotiques afin de limiter la progression de la maladie et potentiellement de permettre sa régression.

Au cours de la CLD et plus particulièrement lors d'une NASH, les KCs répondent aux DAMPs et PAMPs du tissu lésé par la production d'un panel de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques (Tran et al. 2020). Cela participe au recrutement de monocytes qui se différencient en MoDMacs et en MoKCs (Tran et al. 2020) et à l'activation des HSC qui se différencient en myofibroblastes qui produisent de la MEC (Roohani et Tacke 2021).

Cependant, même si les modèles de NASH murins peuvent récapituler la maladie telle qu'elle se développe chez l'homme (Machado et al. 2015), les études portées spécifiquement sur le rôle des KCs n'ont pas été menées jusqu'au stade fibrotique de la maladie (Tran et al. 2020). Le rôle des KCs dans la fibrose hépatique n'est donc pas clairement établi.

Toutefois, une étude menée sur la pathologie humaine a clairement démontré par scRNAseq et par immunohistochimie que les KCs n'étaient pas localisées au niveau du dépôt de MEC dans la cirrhose du foie mais qu'on y retrouvait plutôt des MoDMacs (P Ramachandran et al. 2019). Dans ce même contexte les KCs humains expriment

d'avantage de PD-L1 et ont un phénotype plus immunosuppresseur que dans un foie sain (Pose et al. 2021). Ainsi, même si elles ne contribuent pas directement à réguler la fibrose hépatique, les perturbations phénotypiques des KCs pourraient jouer un rôle important dans la dysfonction immunitaire associée à la CLD.

Enfin, si les LT CD8+ et les NKT semblent avoir un rôle crucial dans le développement de l'HCC (Wolf et al. 2014), que la littérature foisonne d'études témoignant de l'implication des macrophages (Cassetta et Pollard 2018; Galdiero et al. 2013; Noy et Pollard 2014; Ruffell et Coussens 2015), rien n'a été exploré à ce jour concernant le rôle spécifique des KCs. Et puisqu'elles semblent avoir un rôle à jouer dans les étapes précédentes de la maladie, il serait nécessaire de créer des modèles inductibles permettant de moduler la fonction de ces cellules au moment de la transition vers l'HCC.

OBJECTIFS DE THESE

Les révolutions agricoles et industrielles du XX^{ème} siècle ont radicalement modifié nos modes de vie. Réorganisant nos habitudes sociales et réorientant nos centres d'intérêt, l'homme occidental est sédentaire, enclin à un travail globalement assisté par les nouvelles technologies et s'alimente mal. Cela a conduit à l'émergence de MCV qui représentent la première cause de mortalité au monde (OMS). Un des facteurs de risque majeur au développement de ces maladies est l'hypercholestérolémie (OMS). Elle est caractérisée par une élévation du LDLc dans le plasma qui initie l'athérogenèse. L'homéostasie du cholestérol est finement régulée par l'intestin et le foie mais plusieurs études indiquent que le système immunitaire, notamment par le biais des macrophages, pourrait lui aussi être impliqué. En effet, l'équipe a montré qu'une perturbation du nombre de macrophages pouvait impacter l'hypercholestérolémie et le développement de l'athérosclérose (Bouchareychas et al. 2015; Gautier et al. 2009; Shearn et al. 2012). Si les modèles de souris utilisés dans ces études ne permettent pas de cibler les populations de macrophages impliquées dans ces modulations, des données suggèrent que les KCs, les ResMacs du foie, pourraient jouer un rôle. Ces dernières années, les recherches menées sur les ResMacs se font plus nombreuses. Une attention particulière a été portée sur les KCs montrant leur implication dans des contextes pathologiques tels que des infections (Blériot et al. 2015; Lai et al. 2018), l'hémolyse intravasculaire (I. Theurl et al. 2016) et plus récemment la NASH (Devisscher et al. 2017; Remmerie et al. 2020; Tran et al. 2020). D'autres études ont aussi pu mettre en évidence les acteurs moléculaires essentiels à l'identité des KCs. Parmi eux on retrouve le récepteur nucléaire *Lxra*, un facteur de transcription clé du contrôle du contenu intracellulaire en cholestérol des macrophages.

Considérant le fait que les KCs soient la plus large population de ResMacs, qu'elles soient contrôlées par un facteur impliqué dans l'homéostasie du cholestérol et qu'elles résident au sein d'un tissu qui joue un rôle clé dans cette homéostasie, **nous avons fait l'hypothèse que le métabolisme du cholestérol et les KCs pouvaient être intriqués.**

Afin d'essayer de répondre à cette hypothèse, j'ai donc mené des recherches à partir d'un modèle de souris déficient pour le récepteur aux LDL, la souris *Ldlr*^{-/-}, et nourri avec un régime riche en cholestérol afin d'induire une hypercholestérolémie.

Mes objectifs de thèse ont été de répondre aux questions suivantes :

- 1) L'hypercholestérolémie impacte-elle l'homéostasie des KCs ?
- 2) Sont-elles capables d'y répondre ? Quels mécanismes seraient impliqués?
- 3) L'altération de l'homéostasie des KCs a-t 'elle un impact sur le développement de l'athérosclérose ?

Les résultats de mes travaux de thèse ont été formatés sous forme d'un article scientifique intitulé « Loss of embryonically-derived Kupffer cells in the context of hypercholesterolemia accelerates atherosclerosis development » qui sera soumis pour publication sous peu.

RESULTATS DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Loss of embryonically-derived Kupffer cells in the context of hypercholesterolemia accelerates atherosclerosis development

Rebecca Fima¹, Sébastien Dussaud ¹, Cheima Benbida¹, Margault Blanchet¹, Francois Lanthiez², Lucie Poupel^{1,3}, Claudia Brambilla, Martine Moreau¹, Philippe Lesnik¹, Alexandre Boissonnas², Emmanuel L. Gautier¹ and Thierry Huby^{1*}

¹ Sorbonne Université, INSERM, UMRS 1166, 75013 Paris, France

² Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Cimi-Paris, 75013 Paris, France.

³ currently affiliated to Inovarion Paris, France

*** Address correspondence to:**

Dr Thierry Huby, Sorbonne Université, INSERM, UMRS 1166, Paris, France

Tel: 33(1)40779504; e-mail: thierry.huby@sorbonne-universite.fr

Loss of embryonically-derived Kupffer cells in the context of hypercholesterolemia accelerates atherosclerosis development

Rebecca Fima¹, Sébastien Dussaud¹, Cheima Benbida¹, Margault Blanchet¹, Francois Lanthiez², Lucie Poupel^{1,3}, Claudia Brambilla, Martine Moreau¹, Philippe Lesnik¹, Alexandre Boissonnas², Emmanuel L. Gautier¹ and Thierry Huby^{1*}

Abstract

Hypercholesterolemia is a major risk factor for atherosclerosis and associated cardiovascular diseases. The liver, that plays in major role in cholesterol homeostasis, harbors the largest population of resident macrophages, Kupffer cells (KCs) that ensure key functions in tissue homeostasis and blood immune surveillance. However, how KCs homeostasis is affected by the build-up of cholesterol-rich lipoproteins in the circulation has not been investigated. Following induction of hypercholesterolemia, we found that KC accumulated large amounts of cholesterol, in part through scavenger receptor CD36, activating a lipid gene signature resembling that of atherosclerotic foamy macrophages. Embryo-derived KCs (EmKCs) first proliferated and expanded in response to hypercholesterolemia but their numbers gradually diminished while monocyte-derived KCs (MoKCs) seeded the pool and self-maintained. These recruited MoKCs exhibited reduced cholesterol-loading capacities compared to EmKCs. Depletion of EmKCs while maintaining MoKCs exacerbated hypercholesterolemia and accelerated atherosclerosis development. Together, our data reveal that KC pool homeostasis is perturbed during hypercholesterolemia which may increase the risk of atherosclerosis.

Main

Atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) and its clinical outcomes such as myocardial infarction are a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Multiple lines of evidence have established that hypercholesterolemia, and primarily high concentrations of cholesterol-rich LDL lipoproteins¹ and their oxidatively damaged forms (oxLDL)² are implicated in ASCVD. Beside liver and intestine as major organs in regulating plasma cholesterol levels, several lines of evidence suggest the immune system could also participate. Indeed, modulation of tissue-resident macrophage (trMac) pools resulted in changes in plasma cholesterol in

hypercholesterolemic mice³⁻⁵. Those trMacs that populate all organs are best known for their immune roles relying on their phagocytic activity, which is necessary to maintain tissue homeostasis by clearing dead cells or pathogens. However, trMac are now increasingly recognized as serving accessory roles in tissue development, homeostasis and repair⁶. Reducing^{3,5} or increasing⁴ trMac survival capacities associated with plasma cholesterol elevation or reduction, respectively. Yet, the specific tissue Macs involved were not identified. Nonetheless, these models shared in common a modulation in the hepatic trMacs, Kupffer cells (KCs), arguing for their potential implication in the control of cholesterolemia.

Located in the hepatic sinusoids, KCs are the largest trMac population in direct contact with blood and thus with circulating lipoproteins. They are seeded from various progenitor waves during embryogenesis and maintain by self-renewal independently from circulating monocytes in the steady-state adult liver⁷⁻⁹. However, when the embryonic KC (EmKC) network is altered during pathological conditions such as those occurring during non-alcoholic steatohepatitis (NASH)¹⁰⁻¹³, excessive intravascular hemolysis¹⁴, bacterial¹⁵ or parasitic¹⁶ infections, or experimentally^{17,18}, blood monocytes can be recruited to the liver and differentiate into KCs. These monocyte-derived KCs (MoKCs) exhibit an overall similar transcriptomic profile, but may display altered functions with pathological consequences as recently demonstrated in NASH¹¹. In the sinusoids, KCs closely interact with liver sinusoidal endothelial cells (LSECs), hepatic stellate cells (HSCs) and hepatocytes in order to acquire their tissue-imprinted signature as well as the signals allowing them to self-maintain^{19,20}. Notably, Notch signals from LSECs synchronize with BMP9 produced from HSCs to induce the transcription factor LXR- α ¹⁹, a nuclear receptor that controls cellular cholesterol export in the macrophage²¹ and that is essential for KCs survival^{20,22}.

Here, we evaluated whether KCs homeostasis was disturbed in the context of hypercholesterolemia using cholesterol-fed mice deficient for the LDL receptor (LDLr-/-). Our findings reveal that prolonged hypercholesterolemia results in a gradual loss of heavily cholesterol-loaded EmKCs with their replacement with MoKCs with diminished ability to uptake lipoprotein-derived cholesterol. Diphtheria toxin treatment of Cd207-DTR mice to specifically deplete EmKCs suggests these resident macrophages may contribute to generally maintain cholesterol homeostasis and limits atherosclerosis.

Results

Kupffer cell pool is markedly increased following induction of hypercholesterolemia. To characterize the potential changes in liver leukocytes population following induction of hypercholesterolemia, LDLr-/- mice were subjected to a chow diet enriched with 1% cholesterol (HC diet) for 4 days (Fig. 1A). Cholesterolemia was raised 4 times, reaching approximately 1000 mg/dL (Fig. 1A). After liver perfusion to eliminate blood cells contamination, flow cytometry analysis was performed to broadly identify common liver leukocytes populations. A t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) analysis revealed no major changes, except for Kupffer cells (KCs), between chow and HC diet feeding conditions. Clearly identified by the

classical KC marker VSIG4, KCs distributed very differently in tSNE projections between conditions (Fig. 1B). RNA sequencing performed on cell sorted KCs of chow- and HC-fed (4 days) mice revealed numerous gene expression changes (Fig. 1C). KEGG pathway analysis of the up-regulated genes in the HC-fed condition showed association with cholesterol metabolism but also with lysosome and phagosome, thus suggesting activation of processes such as endocytosis, phagocytosis and/or autophagy (Fig. 1D). Highlighted pathways were also suggestive of intense metabolic activities (metabolism of xenobiotics, arginine biosynthesis, drug metabolism, ribosome). Interrogation of the GSEA Molecular Signatures Database (MSigDB) confirmed such activities (Xenobiotic, Mtorc1 signaling, Glycolysis) in addition to activation of genes involved in cell cycling (G2m checkpoint, Mitotic spindle) (Fig. 1D). Our previous studies have demonstrated that all CLEC2^{hi} leukocytes in the healthy or diseased liver identified KCs¹¹ by flow cytometry. Following induction of hypercholesterolemia, CD45⁺CLEC2⁺ KCs showed particularly high expression for CLEC2. Nevertheless, these KCs displayed, similar to the chow condition, homogeneous surface expression for the well characterized CLEC4F, VSIG4 and TIMD4 embryo-derived KC (EmKCs) markers^{11,17} (Fig. 1E). Absolute count numbers in the livers of the mice demonstrated a 2-3-fold increase in EmKCs in the HC-fed condition (Fig. 1F). Increase KC density was confirmed by immunofluorescence microscopy of frozen sections using E-Cadherin staining to demarcate periportal regions²³ and CLEC4F staining to identify KCs (Fig. 1G). These results combined with evidence of gene signatures related to cell cycle in KCs of HC-fed LDLr^{-/-} mice led us to analyze these cells for the proliferation marker KI-67. The results showed approximately a 4-fold increased proportion of KI-67⁺ EmKCs in livers of mice fed the HC diet for 4 days as compared to mice fed the chow diet (Fig. 1H). This increased proliferative state of EmKCs was visible as soon as 3 days after switching the mice to the HC diet (Extended data Fig1). Colony-stimulating factor 1 (CSF1) produced primarily by stellate cells in the steady-state liver is thought to play a critical role in KCs self-renewal and proliferation of recruited monocyte-derived KCs¹⁹. RT-qPCR measurement of CSF1 expression in livers of LDLr^{-/-} mice following induction of hypercholesterolemia showed a progressive elevation from day 2 to day 4 (Fig. 1I). Instead, IL-34 the other known ligand of CSF1 receptor (CSF1R) was only minimally increased (data not shown). Administration of PLX3397, an inhibitor of CSF1R, to LDLr^{-/-} mice during the first 2-days of HC diet feeding fully blocked the increased proliferation phase of EmKCs and the increase of KCs numbers (Fig. 1J). Thus, KC pool expansion by proliferation in response to induction of a hypercholesterolemic state is a CSF1R signaling dependent mechanism.

Massive cellular accumulation of cholesterol occurs in Kupffer cells following induction of hypercholesterolemia

To further characterize the cellular changes occurring in EmKCs in the context of hypercholesterolemia, the cholesterol biosynthesis gene dataset was run on DEG of our RNAseq using phantasm software. The analysis revealed a clear downregulation of this pathway in the HC-fed condition (Fig 2A). Such effect is usually observed in lipid (cholesterol) loaded cells. Using EnrichR to search for similarities in previously published GEO mouse data

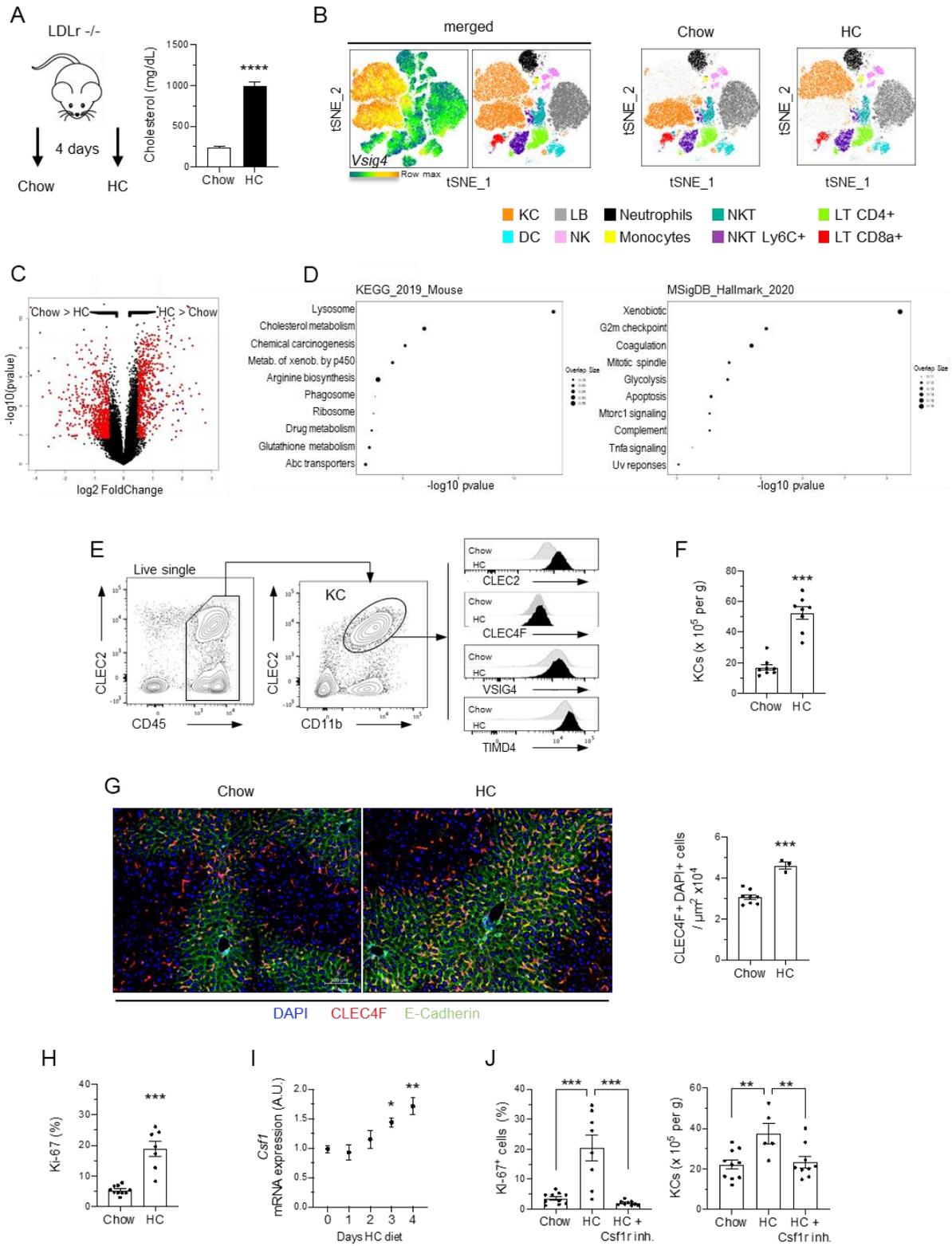


Figure 1

Fig. 1 Kupffer cell pool rapidly expands in response to induction of hypercholesterolemia.

(A) Plasma total cholesterol concentration in LDLr^{-/-} male mice fed a chow diet (n=8 mice) or chow diet supplemented with 1% cholesterol (HC) (n=7 mice) for 4 days. (B) tSNE projections of identified leukocytes by flow cytometry in livers of chow-fed or HC-fed LDLr^{-/-} mice for 4 days. High expression of VSIG4 identifies KC population. (C) Volcano plot depicting differentially expressed genes (fold change >1.3 and adjusted p-value > 0.05 are shown in red) in sorted KCs (CD45⁺CLEC2⁺TIMD4⁺CD31⁻) from livers of chow-fed or HC-fed LDLr^{-/-} mice for 4 days. (D) Pathways enriched in KCs in response to hypercholesterolemia induction. (E) Flow cytometry analysis of KCs and histograms showing the level of expression of the common KC markers CLEC2, CLEC4F, VSIG4 and TIMD4 in both chow- and HC-fed conditions. (F) KC density in livers of chow- (n=8 mice) and HC-fed (n=8 mice) LDLr^{-/-} male mice for 4 days, as determined by flow cytometry. (G) Representative images of epifluorescence microscopy of livers of chow- and HC-fed (4 days) LDLr^{-/-} male mice showing expression of Clec4F (red). E-Cadherin (green) staining highlights the preferential localization of KCs in periportal regions. Nuclei (DAPI) are shown in blue. Quantification of CLEC4F⁺ and DAPI⁺ cells density confirmed increased values in HC-fed (4 days, n=3) as compared to chow-fed (n=8) LDLr^{-/-} mice. (H) Percentage of Ki-67⁺ cells among Clec2⁺ KCs of chow (n=10) or HC-fed (n=8) LDLr^{-/-} male mice, confirming increased KCs proliferation following induction of hypercholesterolemia. (I) *Csf1* gene expression fold-increase in livers of LDLr^{-/-} male mice fed HC diet for the indicated days (n=12, 3, 7 6 and 10 mice for day 0, 1, 2, 3 and 4, respectively). Data are expressed relative to day 0 and p values correspond to statistical differences versus day 0. (J) Percentage of Ki-67⁺ KCs and KC numbers in LDLr^{-/-} female mice fed a chow or HC diet for 3 days and treated with PLX3397 (CSF1R inhibitor) or vehicle.

sets in the up-regulated gene list of our HC condition, we identified the GSE116239 dataset corresponding to transcriptomic profiles of intimal foamy and non-foamy macrophage in atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} mice²⁴. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using the 250 most up-regulated genes in foamy macrophages of this dataset clearly identified a specific enrichment of these genes in sorted EmKCs of HC-fed LDLr^{-/-} mice (Fig. 2A). In the study of Kim *et al*²⁴, these atherosclerotic foamy macrophages were characterized as cells with high granularity and strong bodipy 493/503 staining for lipids. Flow cytometry analyses of liver leukocytes in our study also showed an elevated granularity (SSC-A parameter) for KCs in hypercholesterolemic mice (Fig. 2B) that associated with high MFI for bodipy (Fig. 2C). These results suggested that KCs were lipid laden. Targeted lipidomic for cholesterol was performed on sorted KCs and showed a 4-fold and 15-fold increase in free cholesterol and cholesteryl-esters (CE) contents in KC under HC condition as compared to chow (Fig. 2D). CE derived from the monounsaturated fatty acid oleate (CE 18:1) was the most prevalent form present in cholesterol loaded KCs (Fig. 2D). Two-photon laser scanning microscopy combined with Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy to detect lipids in livers of LDLr^{-/-} mice fed chow and HC diet for 4 days demonstrated the presence of numerous lipid droplets in KCs in the hypercholesterolemic condition (Fig. 2E). As expected in hypercholesterolemic mice, larger lipid droplets were also detectable in hepatocytes (Fig. 2E). Considering the increase number of KCs following induction of hypercholesterolemia, it could be roughly estimated a 25-fold increase of cholesterol content in the whole KC pool in the HC-fed condition (Extended data Fig. 2A). Lipidomic analysis of the liver revealed that, after 4 days of HC diet, cholesterol tissue content raised only by 2-fold, and primarily in the storage form of CE (Extended data Fig. 2B).

Nevertheless, the amount of cholesterol present in KCs represented only 0.25% of total hepatic cholesterol content.

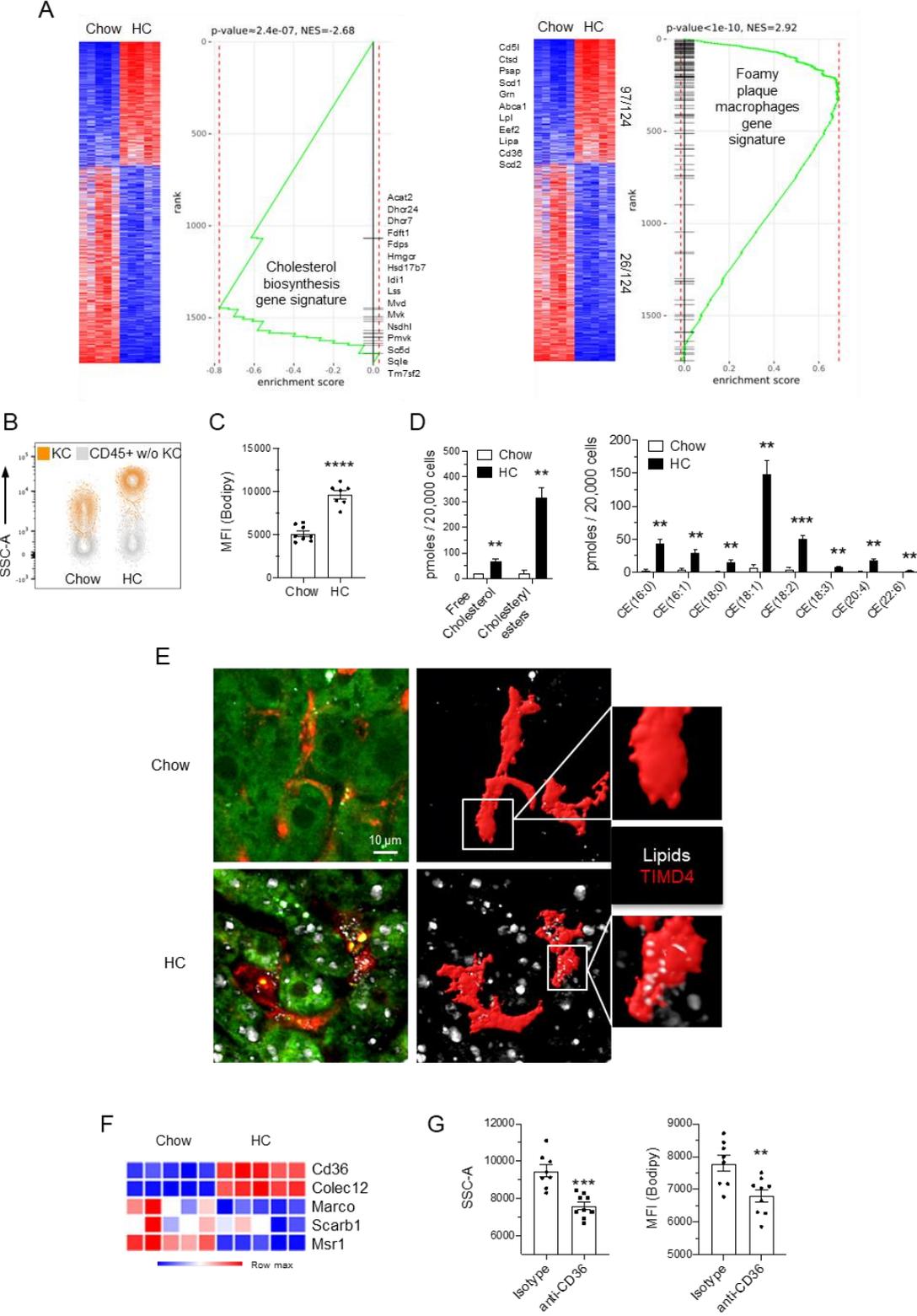


Figure 2

Fig. 2 Hypercholesterolemia generates cholesterol-loaded foamy Kupffer cells.

(A) Gene Set Enrichment analysis (GSEA) of the reactome_cholesterol_biosynthesis and foamy plaque macrophages gene signatures in KC from chow- and HC-fed (4 days) LDLr^{-/-} mice using the Phantasus software. The foamy plaque macrophages gene signature was generated from a previously published dataset (GSE116239). (B) KCs in HC-fed mice exhibit high granularity (SSC-A^{hi}) and (C) strongly stained for lipids with bodipy. (D) Changes in cholesterol content, and in major cholesteryl-esters species in KCs sorted from chow- and HC-fed (4 days) LDLr^{-/-} mice. (E) Two-photon laser scanning microscopy images of the liver of LDLr^{-/-} mice showing the presence of numerous lipid droplets (white spots), as detected by Coherent anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS), in TIMD4⁺ (red; 3D reconstruction by mask rendering on the right images) KCs of HC-fed (4 days) LDLr^{-/-} mice. The presence of lipid droplets in the hepatocytes (autofluorescence in green) of HC-fed mice as compared to the chow condition is also clearly visible (F) Heatmap generated from the RNAseq depicting the level of expression of scavenger receptors in KCs from chow- and HC-fed (4 days) LDLr^{-/-} mice. (G) Changes in the granularity (SSC-A) and lipid content (bodipy) of KC in mice fed HC diet overnight and injected *in vivo* with either isotype or anti-CD36 antibodies.

Considering the phagocytic nature of KCs, we hypothesized that formation of cholesterol-laden KCs in the hypercholesterolemic environment would result from uptake of modified forms of LDL, as it occurs in atherosclerotic foamy macrophages. Among different scavenger receptors involved in the uptake of modified LDLs, CD36²⁵ and Colec12²⁶ were found to be up-regulated in HC-fed KCs (Fig. 2F). To test the potential involvement of CD36, LDLr^{-/-} mice were administered a CD36 blocking mAbs²⁷ or isotype and then fed HC diet for 1 day. Antibody treatment resulted in decreased granularity as well as bodipy staining (Fig. 2G). Thus, cholesterol loading was, at least partially, dependent on CD36.

We next sought to exclude the possibility that the changes observed in KCs were derived from other mechanisms than the hypercholesterolemic state, such as dietary cholesterol-induced gut microbiota dysbiosis²⁸. To do so, LDLr^{-/-} mice were treated with the selective cholesterol absorption inhibitor ezetimibe while given cholesterol in the diet. A pre-treatment period with ezetimibe before addition of cholesterol was set up to ensure full activity of the inhibitor (Fig. 3A). Ezetimibe treatment fully blocked plasma cholesterol elevation when mice were switched to HC diet (Fig. 3B). As a result, KCs proliferative response (Fig. 3C), pool expansion (Fig. 3D) and lipid loading (Fig. 3E) were abolished, demonstrating that induction of hypercholesterolemia was the only triggering effect.

Monocyte-derived KC with reduced cholesterol-loading sustain the KC pool that contracts during prolonged hypercholesterolemia exposure.

We next evaluated the consequences of prolonged hypercholesterolemia on KC homeostasis. Female LDLr^{-/-} mice were fed HC diet for 3 weeks and analyzed at different time points during this period (Fig. 4A). After the initial pool expansion observed at day 4, KC numbers rapidly dropped towards a normal KC pool density (Fig. 4B). In previous work, TIMD4 expression was shown to be essentially absent on monocyte-derived KCs^{11,17}. During the 3-weeks HC diet feeding, the percentage of CLEC2⁺TIMD4⁻ cells among KC remained low until day 8 where it started to significantly raise (Fig. 4C). By day 21, approximately 50% of KCs were TIMD4⁻ (Fig. 4D), suggesting that MoKCs were generated to sustain the pool. Absolute cell quantification during the time course clearly showed the progressive engraftment of MoKCs while EmKCs

numbers, after a short expansion phase, rapidly decreased (Fig. 4E). Of note, in the context of a *Ccr2*^{-/-}-background in which circulating Ly6C^{hi} monocytes numbers are markedly reduced²⁹, CLEC2⁺TIMD4⁻ KCs were not generated in *LDLr*^{-/-} mice subjected to hypercholesterolemia for 3 weeks (Extended data, Fig.3). These results confirmed the monocyte origin of these cells. To evaluate whether inflammatory monocyte-derived macrophages (MoDMacs) were also recruited to the liver in this context, CLEC2⁻ macrophages were searched by flow cytometry analysis as previously described¹¹. While increased numbers of Ly6C⁺ monocytes could be seen in the liver after 3 weeks of HC diet, very few MoDMacs could be evidenced (Extended data, Fig.4). We next quantified the level of hepatic *Csf1* mRNA expression to determine whether the rapid decrease in EmKCs could be the result of a diminished maintenance signaling from the KC niche. *Csf1* expression progressively increased till day 8 and then decreased but remained 2-fold more elevated as compared to the control chow condition (Fig. 4F). Thus, decreased EmKCs numbers after day 4 could likely not be the consequence of low amount of CSF1 available between day 4 and 8 as its expression kept rising during this time frame. As earlier noticed in the context of NASH¹¹, MoKCs presented with a 2-3-fold higher proliferative state than EmKCs after 3 weeks of HC diet (Fig. 4G). At this time point, EmKCs proliferated at rates similar to those seen under chow-fed conditions (Fig. 1H). Thus, increased proliferation could confer an advantage to MoKCs as compared to their embryonically-derived counterpart in colonizing the KC niche in the hypercholesterolemic environment. In addition, these MoKCs exhibited reduced granularity (Fig. 4H) and lipid staining (Fig. 4I), as compared to EmKCs. Reduced CE content, and less free cholesterol, primarily accounted for this diminished lipid

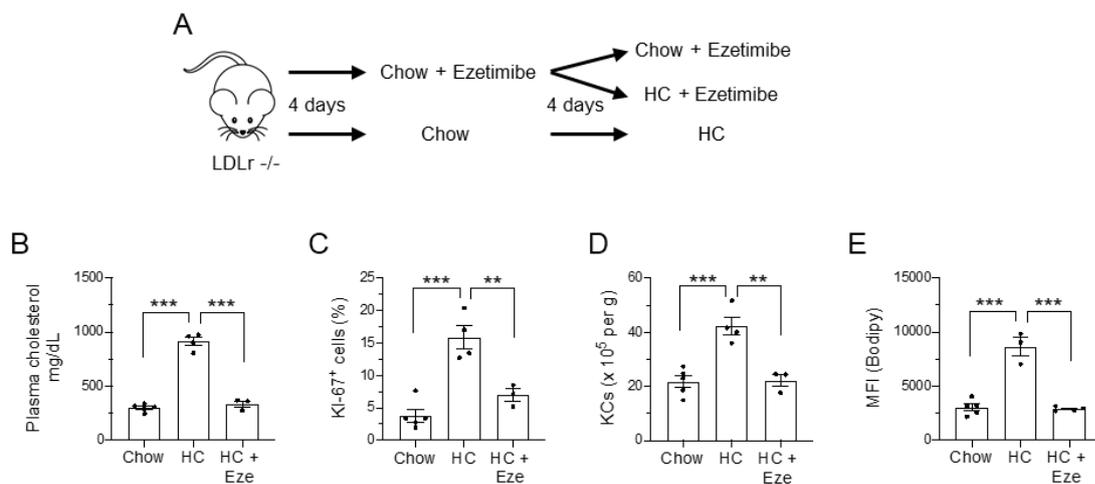


Figure 3

Fig. 3 Hypercholesterolemia is the only trigger for KC proliferation, pool expansion and foamy phenotype.

(A) Experimental plan for ezetimibe treatment to block intestinal cholesterol absorption. (B) Feeding ezetimibe to *LDLr*^{-/-} mice fed HC diet blocked plasma cholesterol elevation, resulting in (C) no increased proliferation (as determined by Ki-67 staining) (D), no increased pool density, and (E) no lipid loading (bodipy) of KCs. (n=4, 4 and 3 for chow-, HC- and HC+eze-fed *LDLr*^{-/-} male mice, respectively)

loading in MoKCs (Fig. 4J) and was visible for all CE species measured (Extended data Fig. 5). Changes in KCs homeostasis upon prolonged hypercholesterolemia was also conducted with male LDLr^{-/-} mice (Extended data Fig. 6A). The results obtained were comparable to those in females, albeit some gender differences were notable. EmKC pool contraction following the early proliferative phase was less abrupt and started after day 8 (Extended data Fig. 6B-C). Concomitantly, MoKCs engrafted later after day 8 and their proportion among the KC pool after 3 weeks of diet was twice as less than that seen in females (Extended data Fig. 6D). Reduced granularity (Extended data Fig. 6E) and lipid loading (Extended data Fig. 6F) in MoKCs as compared to EmKCs were also observed in males.

RT-qPCR performed on sorted EmKCs and MoKCs showed decreased expression of the scavenger receptors *CD36*, *Colec12* and *Marco* but unchanged expression for *Scarb1* and *Msr1* (Fig. 4K). Lower expression for CD36 protein at the surface of MoKCs was confirmed using flow cytometry (Fig. 4L). Thus, we sought to functionally assess whether such decreased expression of these receptors could translate into a diminished capacity of MoKCs to uptake modified lipoproteins. Copper-oxidized LDL were prepared and labeled with bodipy to allow detection of lipoprotein uptake in cells by flow cytometry. LDLr^{-/-} mice were fed HC diet for 3 weeks to generate MoKCs and switch back to chow diet to reduce the cellular fluorescence background generated by KCs lipid loading. Intravenous injection of bodipy-labeled ox-LDL resulted in increased MFI for bodipy fluorescence for both EmKCs and MoKCs, as compared to control injections with unlabeled oxLDL (Fig. 4M). Nevertheless, MoKCs exhibited significantly less bodipy staining than that measured in EmKCs, suggesting a reduced capacity for MoKCs to scavenge modified lipoproteins.

Altogether, these results show that following a major EmKCs pool expansion in response to induction of hypercholesterolemia, the KC pool is remodeled with a major reduction in the number of heavily cholesterol-loaded EmKCs and the engraftment of hyperproliferative MoKCs displaying a decreased capacity to uptake lipids.

Protection of EmKCs from apoptosis diminished MoKCs engraftment during hypercholesterolemia

Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress are important triggers of macrophage foam cell apoptosis and actors in the development of atherosclerosis³⁰⁻³³. In particular, modified forms of LDL can induce the production of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) that generate cellular oxidative stress and damage^{31,33}. We thus sought to determine whether foamy KCs in the hypercholesterolemic context were undergoing similar mitochondrial stress. Flow cytometry analysis of KCs for the mitochondria-specific ROS indicator MitoSox showed that MitoSox fluorescence in EmKCs raised by 1.6- and more than 3-fold when LDLr^{-/-} mice were fed the HC diet for 4 and 21 days respectively (Fig. 5A), thus suggesting progressive accumulation of superoxide in EmKCs overtime. At 21 days, mitochondrial ROS detection in MoKCs demonstrated significantly less signal than that measured in EmKCs (Fig. 5B).

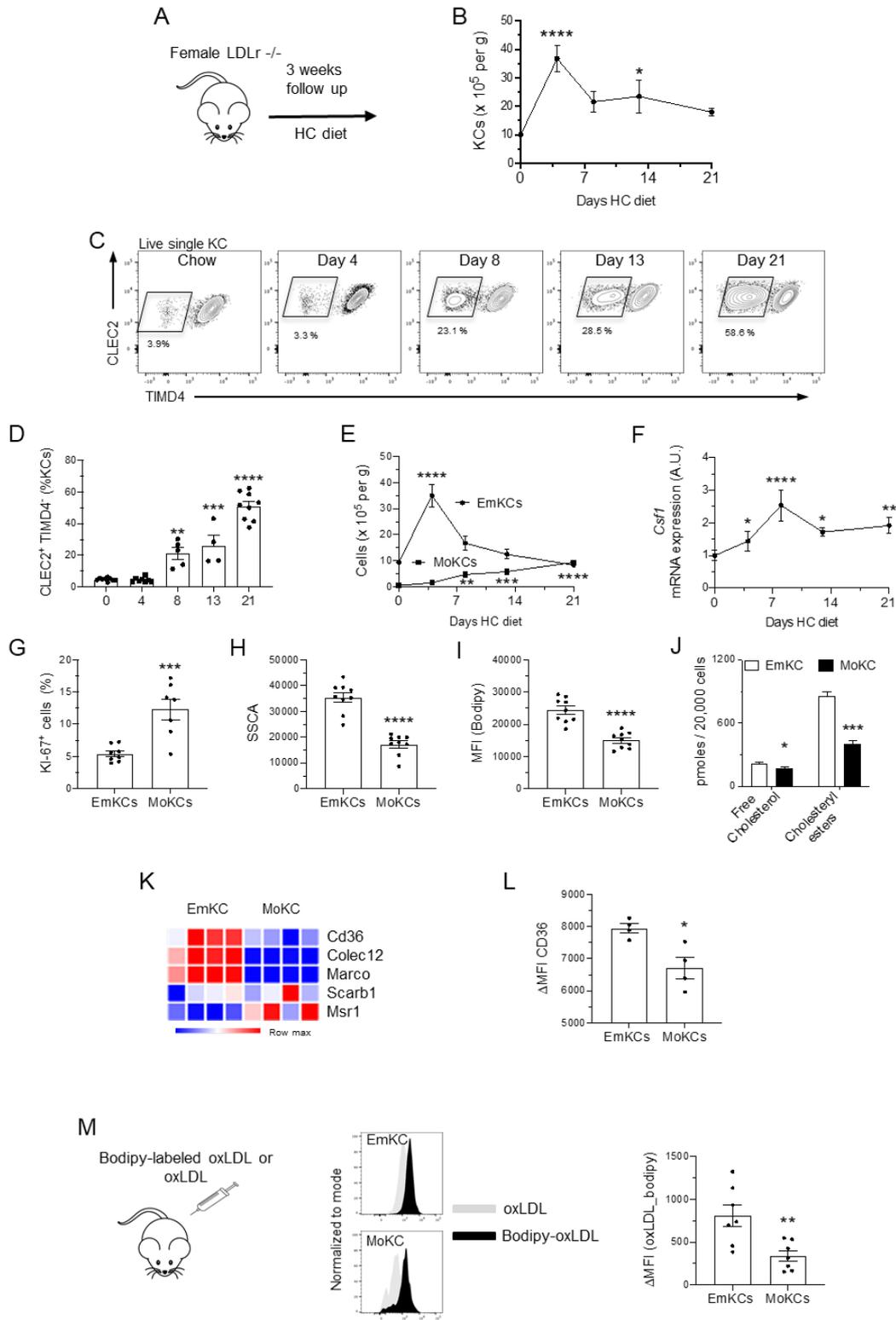


Figure 4

Fig. 4 Long term exposure to hypercholesterolemia generates monocyte-derived KC with reduced lipid-loading capacity.

(A) Experimental plan (B) Total KC numbers were determined by flow cytometry before and 4, 8, 13 and 21 days after induction of hypercholesterolemia. (C) Representative flow cytometry analysis showing the progressive increase of CLEC2+TIMD4- KCs with prolonged exposure of the mice to hypercholesterolemia. (D) Quantification of CLEC2+TIMD4- KCs frequency among KCs (n=9, 8, 5, 4 and 8 mice for experimental points 0, 4, 8,13, and 21 days). (E) EmKCs and MoKCs numbers determined by flow cytometry before (n=9) and at 4 (n=8), 8(n=5), 13(n=4) and 21 (n=8) days after induction of hypercholesterolemia. Indicated p values correspond to significant statistical differences to day 0. (F) *Csf1* gene expression (normalized to day 0) in livers of LDLr^{-/-} mice fed HC diet for the indicated days (n=9, 8, 5, 4 and 8 mice for day 0, 4, 7, 13 and 21, respectively). Indicated p values correspond to significant statistical differences to day 0. (G) Percentage of Ki-67⁺ cells among EmKCs and MoKCs in HC-fed female LDLr^{-/-} mice for 3 weeks. (H) Granularity and (I) lipid content (bodipy) of EmKCs and MoKCs of mice fed HC diet for 3 weeks. (J) Lipidomic analysis of sorted EmKCs and MoKCs of mice fed HC diet for 3 weeks (K) Heatmap depicting the level of mRNA expression of scavenger receptors determined by qPCR on sorted EmKCs and MoKCs from LDLr^{-/-} mice after 3 weeks of HC diet (L) CD36 mean fluorescence intensity (Δ MFI = CD36 MFI minus MFI of non-stained cells in the corresponding fluorescent channel) determined by flow cytometry on EmKCs and MoKCs at 3 weeks of HC diet (n=4 female mice). (M) Histograms showing MFI in the FITC (bodipy) channel for EmKCs and MoKCs after *in vivo* injection of oxidized-LDL labeled with bodipy or no. The Δ MFI between the conditions is provided for both EmKCs and MoKCs (n=7 mice).

With these results, we wondered whether protecting EmKCs from mitochondrial stress would influence MoKCs generation, as we earlier demonstrated in the lipotoxic NASH environment¹¹. Thus, a similar approach was undertaken by producing hypercholesterolemic chimeric mice exhibiting enforced expression of the mitochondrial anti-apoptotic protein BCL2 in the myeloid lineage, including KCs. *Cd68-hBCL2*²⁴ mice crossed in a *Ccr2*^{-/-} background were submitted to low irradiation (3 Gy) and subsequently transplanted with UBC-GFP bone marrow. In this model, bone marrow-derived cells can be traced by expression of the green fluorescent protein. BM transplanted *Ccr2*^{-/-} mice served as controls. Chimeric mice were injected a recombinant adeno-associated virus encoding the gain-of-function form of murine PCSK9^{D377Y} to allow induction of hypercholesterolemia by PCSK9-mediated enhanced lysosomal degradation of hepatic LDL receptors³⁵. Hypercholesterolemia was induced by feeding the animals the HC diet for 3 weeks (Fig. 5C). Analysis of EmKCs showed that only a small proportion expressed GFP (Fig. 5D), in agreement with their embryonic origin and maintenance independently of circulating monocytes. GFP⁺ EmKCs may correspond to few MoKCs that acquired TIMD4 expression with time as previously reported¹¹. In contrary to EmKCs, more than 60% of MoKCs were GFP⁺ and thus derived from GFP⁺ donor cells. The remaining GFP⁻ MoKCs most likely corresponded to host-derived MoKCs that proliferated in response to hypercholesterolemia. The overall frequency of MoKCs was decreased 2-fold in *Cd68-hBCL2* x *Ccr2*^{-/-} recipient mice (Fig. 5E). This was also observed for absolute numbers of MoKCs, whereas EmKCs numbers were increased (Extended data Fig. 7). Finally, quantification of GFP⁺ MoKCs (normalized to liver monocyte chimerism; ~94% and ~84% in *Ccr2*^{-/-} and *Cd68-hBCL2* x *Ccr2*^{-/-} recipients, respectively) demonstrated diminished amount in *Cd68-hBCL2* x *Ccr2*^{-/-} recipient mice (Fig. 5F). Altogether, these results lend support to the conclusion that protection of EmKCs from death, and potentially as a consequence of mitochondrial oxidative stress, limits the recruitment and engraftment of MoKCs under hypercholesterolemia.

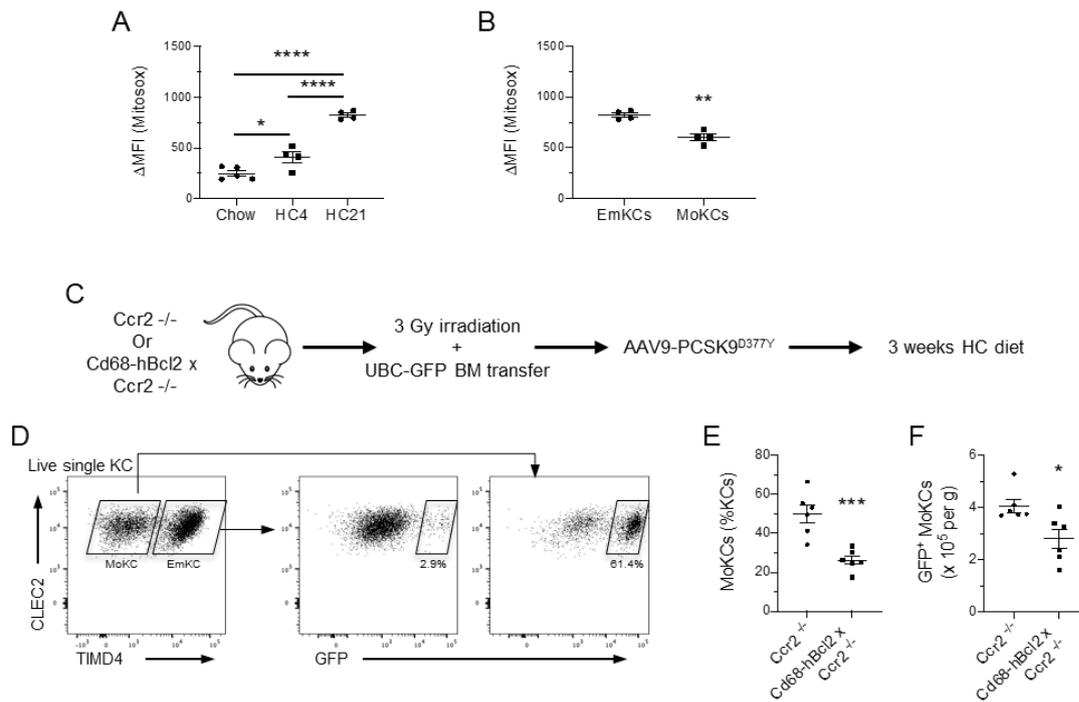


Figure 5

Fig. 5 Protection of EmKCs from mitochondrial apoptosis limits MoKCs generation during hypercholesterolemia

(A) Generation of mitochondrial ROS determined by mitoxox staining in EmKCs of LDLr^{-/-} female mice fed chow or HC diet for 4 or 21 days (n=4 mice in all conditions). (B) Comparative mitoxox staining between EmKCs and MoKCs of LDLr^{-/-} female mice fed HC diet 21 days (n=4 mice). (C) Experimental strategy to generate hypercholesterolemic chimeric mice with apoptosis-resistant EmKCs. (D) Representative flow cytometry analysis showing the contribution of monocyte-derived (GFP⁺) cells to EmKCs and MoKCs. (E) Frequency of MoKCs and (F) absolute numbers of GFP⁺ MoKCs in female Ccr2^{-/-} (n=6 mice) and Cd68-hBcl2 x Ccr2^{-/-} (n=6 mice) chimeras hypercholesterolemic for 3 weeks.

Reducing EmKCs numbers raises cholesterolemia and accelerates atherosclerosis

We next sought to investigate the potential consequences of decreasing EmKC numbers during hypercholesterolemia. To do so, we crossed LDLr^{-/-} mice to Cd207-DTR mice in which systemic DT administration leads to depletion of EmKCs as previously shown¹¹. Mice were injected with DT or heat-inactivated DT (bDT) (Fig. 6A). Total KC numbers were found similar in both groups after 8 days of HC diet (Fig. 6B). However, KC pool homeostasis was substantially changed with diminished EmKC counts in the DT group (Fig. 6B). In addition, while few MoKCs were detectable in the bDT group, EmKCs were replaced by MoKCs in the emptied KC niche by DT treatment (Fig. 6C), representing about 60% of all KCs (Fig. 6D). Lipid staining was slightly increased in the DT group for both EmKCs and MoKCs as compared to corresponding KCs in the bDT group (Fig. 6E). Nevertheless, MoKCs were less lipid loaded than their embryo-derived counterparts for both conditions. Importantly, both groups exhibited similar counts of Ly6C⁺ monocytes and neutrophils (Fig. 6F), confirming previous observations that DT administration did not create overt inflammation^{11,17}. In this new KC niche context, while we did not observe differences in liver cholesterol content between both conditions (data not shown), plasma cholesterol concentrations were found significantly more elevated in the DT group (Fig. 6G).

This plasma cholesterol raising effect seemed relevant to EmKCs depletion as LDLr^{-/-} mice submitted to similar experimental condition with DT and fed HC diet for 8 days did not display elevated cholesterolemia (Extended data Fig. 8). We then explored whether similar observations could be done when HC diet was initiated after a 3 weeks recovery period post-DT administration to Cd207-DTR x LDLr^{-/-} mice (Extended data Fig. 9). EmKC numbers were found decreased in the DT-treated group but to a lesser extent suggesting remaining EmKCs after DT treatment proliferated during the recovery period to partially refill the KC pool that was comparable in both conditions. Nevertheless, MoKCs represented 40% of total KCs in DT-treated mice. Again, no major sign of inflammation was observed and plasma cholesterol levels were found also more elevated in DT mice (Extended data Fig. 9). Then to evaluate the long-term consequences, the experiment was repeated with Cd207-DTR x LDLr^{-/-} female mice administered DT or bDT and then fed the HC diet for 4 weeks (Fig. 6H). Total KC numbers were slightly diminished in DT-treated mice (Fig. 6I), primarily as a consequence of low EmKC counts since MoKCs numbers were found comparable to the bDT-treated group (Fig. 6J). The proportion of MoKCs among CLEC2⁺ KCs was 60% in bDT-treated Cd207-DTR x LDLr^{-/-} female mice (Fig. 6K), consistent with our observations in LDLr^{-/-} female mice under prolonged hypercholesterolemia (Fig. 4D). This proportion raised to 83.5% in the DT group (Fig. 6K). Bodipy staining of KC populations were comparable (Fig. 6L), as well as liver monocytes and neutrophils counts (Fig. 6M) in bDT and DT groups. Finally, as observed at 8 days of HC diet, cholesterolemia remained more elevated in DT-treated mice (1142 mg/dL vs 912 mg/dL in the bDT group, $p=0.007$) (Fig. 6N). These results led us to examine whether such elevation of hypercholesterolemia transposed into increased susceptibility of atherosclerosis. Lipid staining of tissue sections at the level of the aortic sinus revealed 1.6-fold larger intimal atherosclerotic lesions in DT-treated Cd207-DTR x LDLr^{-/-} female mice (Fig. 6N). This experimental protocol was reproduced in male mice and provided similar observations. Notably, DT-treated Cd207-DTR x LDLr^{-/-} males exhibiting significantly reduced EmKC numbers showed elevated hypercholesterolemia that associated with larger atherosclerotic lipid lesions (Extended data Fig. 10). Thus, loss of EmKCs and their subsequent replacement by MoKCs can favor elevation of cholesterolemia and development of atherosclerosis.

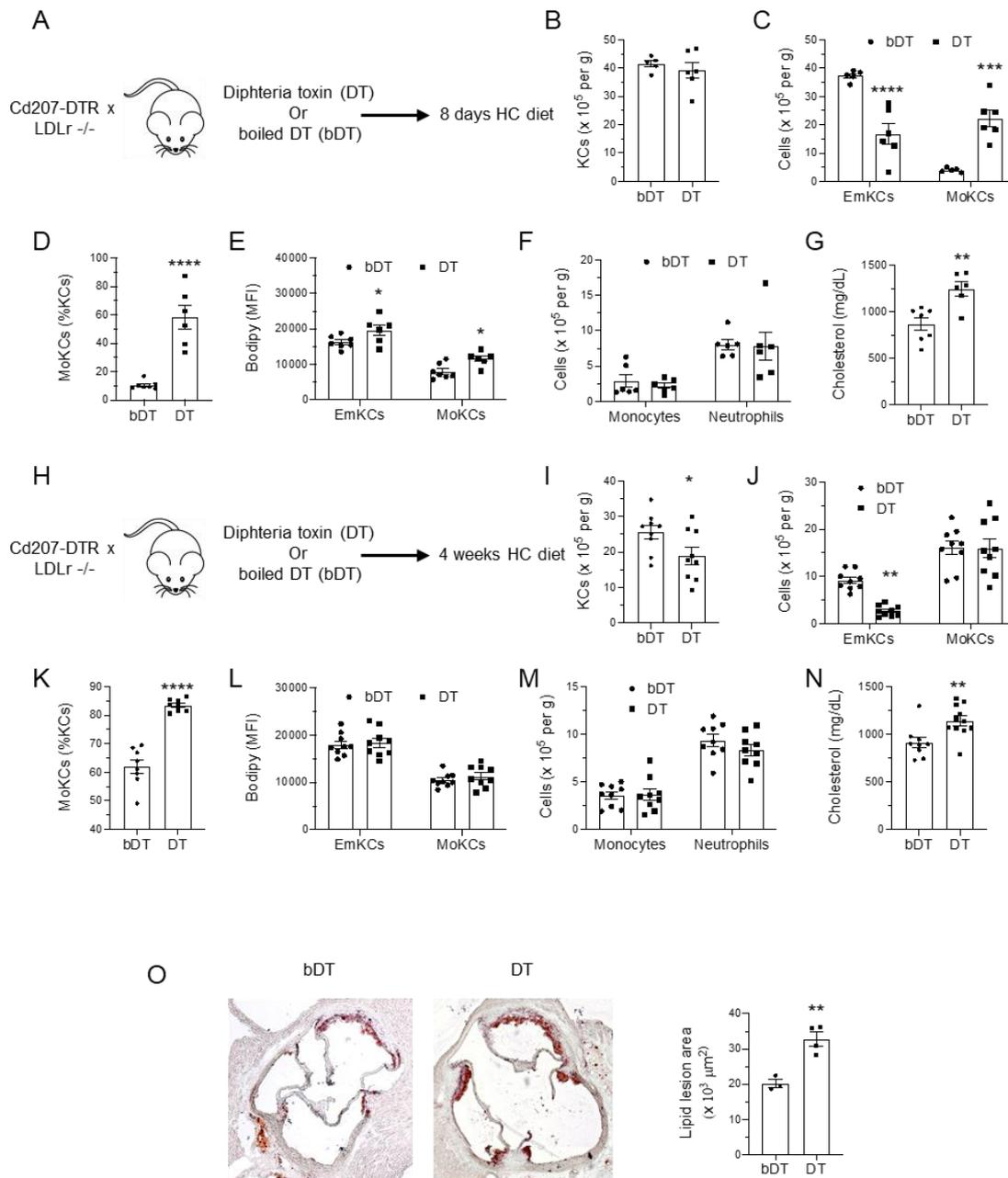


Figure 6

Fig. 6 Loss of EmKCs increases hypercholesterolemia and favors atherosclerosis development.

(A) Experimental strategy and mouse model used to deplete EmKCs in the context of hypercholesterolemia. (B) Total KC and (C) EmKCs and MoKCs absolute numbers in livers of Cd207-DTR x LDLr^{-/-} male mice after 8 days of HC diet and injected either with bDT (n = 7) or DT (n = 6). (D) Percentage of MoKCs (E) Bodipy staining of EmKCs and MoKCs after 8 days HC diet (F) Absolute numbers for liver monocytes and neutrophils (G) Plasma cholesterol concentrations after 8 days HC diet feeding (H) Experimental strategy and mouse model used to deplete EmKCs in the context of hypercholesterolemia for 4 weeks. (I) Total KC and (J) EmKCs and MoKCs absolute numbers in livers of Cd207-DTR x LDLr^{-/-} female mice after 4 weeks of HC diet and injected either with bDT (n = 9) or DT (n = 9). (K) Percentage of MoKCs. (L) Bodipy staining of EmKCs and MoKCs after 4 weeks HC diet (M) Absolute numbers for liver monocytes and neutrophils. (N) Plasma cholesterol concentrations after 4 weeks HC diet feeding. (O) Representative images of the degree of atherosclerosis in the aortic root area of Cd207-DTR x LDLr^{-/-} mice after 4 weeks of HC diet and injected either with bDT or DT. Lipid lesions in the arterial intima were quantified by ORO staining of aortic root sections.

Discussion

The consequences of hypercholesterolemia on the retention of LDL lipoproteins in focal areas of the arterial tree with their engulfment by macrophages to form lipid-laden foam cells have been studied for decades as an early event in the formation of atherosclerotic lesions. Our work here demonstrated that hypercholesterolemia also leads to the generation of heavily cholesterol-loaded Kupffer cells whose homeostasis is perturbed with engraftment of monocyte-derived KCs. In addition, while we recently demonstrated EmKCs as facilitators of hepatic lipid storage in the context of NASH¹¹, the present study now further lend support for a metabolic function of these cells in contributing to cholesterol homeostasis in the context of hypercholesterolemia.

Studying the initial response of EmKCs to elevation of plasma LDL-cholesterol concentration demonstrated a remarkable adaptation of the pool that expanded 2- to 3-fold in male and female mice, respectively. Transcriptomic analysis and KI-67 staining revealed that EmKC pool expansion was due to increased proliferation of the cells. Concomitant increase in liver CSF1 expression combined to blockade of EmKCs proliferation by CSF1R inhibitor strongly supported a major role for the CSF1-CSF1R axis in this adaptative response of the KC niche. While under steady state conditions HSCs have been shown to be the main cellular source of CSF1, LSECs are also able to produce CSF1 in extreme conditions when KCs are depleted¹⁹. This suggests that HSCs, and potentially LSECs, were activated in response to hypercholesterolemia to increase hepatic production of CSF1 and sustain EmKCs proliferative response.

After this rapid increase in EmKCs density, we then observed a progressive contraction of the KC pool. The continuous increase in CSF1 expression overtime did not suggest that this effect was due to a limitation in the amount of local CSF1 available to sustain EmKCs maintenance. Rather, excessive cholesterol loading of EmKCs may have contributed to decrease their survival capacity. Our lipidomic analyses revealed that, while liver tissue increased its cholesterol content as non-toxic esterified forms of cholesterol, EmKCs accumulated large amount of free cholesterol and cholesteryl-esters. Excess free cholesterol in macrophages of advanced atherosclerotic lesions is a potent inducer of their death. Indeed, macrophage free-cholesterol loading has been reported to induce apoptosis, notably by triggering endoplasmic reticulum (ER) stress³⁶ but equally, by increasing mitochondrial oxidative stress and dysfunction³⁷. Progressive increase in mitochondrial ROS observed in EmKCs during HC diet feeding would concur to such scenario. In addition, the involvement of CD36 in EmKCs lipid loading suggested that cholesterol loading is driven by uptake of modified lipoproteins in this hypercholesterolemic context. CD36, as an archetypal pattern-recognition receptor that binds polyanionic ligands, has been linked to atherosclerosis through its recognition of modified endogenous ligands, including oxidized-LDL³⁸. Macrophage uptake of such atherogenic lipoproteins potently induces ER stress and mitochondrial oxidative stress³⁰⁻³², and can even lead to macrophage apoptosis in a CD36-dependent pathway³⁰.

Loss of EmKCs in DTR mouse models^{11,17,20}, in pathological context whereby EmKCs are challenged¹¹⁻¹⁶ or through genetic invalidation of critical genes for KCs survival^{20,22} have been

shown to create niche availability and engraftment of monocyte-derived KCs. This appears to occur also in condition of hypercholesterolemia, as MoKCs started to progressively emerge when EmKC numbers diminished after the proliferative phase. The accelerated and stronger loss of EmKCs in females as compared to males also coincided with a more rapid and larger generation of MoKCs in females. Guilliams and Scott³⁹ proposed that niche accessibility and niche availability were the predominant factors for the engraftment of monocytes in a restricted number of niches per organ. The fact that almost no MoKCs were generated in LDLr^{-/-} x Ccr2^{-/-} mice strongly suggests that signals of niche accessibility require an operant Ccl2-Ccr2 axis in this pathological hypercholesterolemic context. Nonetheless, such signaling can be overcome if the niche is brutally emptied as demonstrated in KC DTR-depletion models in the Ccr2^{-/-} background¹⁹. An observation that we also verified in hypercholesterolemic DT-treated Ccr2^{-/-} x Cd207-DTR mice (data not shown). Protecting cholesterol-loaded EmKCs from death through enforced Bcl2 gene expression, thus limiting niche availability, supported also the proposed concept as we observed less recruitment of MoKCs in hypercholesterolemic Cd68-hBCL2 chimeric mice. These data suggested also that loss of cholesterol-loaded EmKCs upon prolonged exposure to hypercholesterolemia was likely linked to mitochondrial-related stress that could be partially relieved by overexpression of the mitochondrial membrane Bcl2 protein that blocks the apoptotic death. With this in mind, reduced cholesterol uptake capacity concomitant to diminished mitochondrial ROS in recruited MoKCs could confer a competitive advantage to these cells over overloaded EmKCs for niche occupancy. Notwithstanding that MoKCs exhibited a hyperproliferative state as compared to EmKCs, as previously reported during NASH¹¹.

MoKCs have been shown to activate gene expression patterns and display phenotypic characteristics similar to those of EmKCs^{17,19}. Nevertheless, specific transcriptomic differences have also been reported between the two cell types^{11,14,17}, and functional differences were also highlighted^{17,18}. In the context of NASH, we recently revealed that EmKCs were protective over MoKCs, favoring lipid storage and limiting liver damage¹¹. Our study adds further support to a beneficial role of EmKCs as compared to MoKCs, here in the context of hypercholesterolemia. Indeed, we observed that circulating concentrations of cholesterol were increased when MoKCs replaced EmKCs in DT-treated Cd207-DTR mice. This effect was long-lasting and associated with accelerated atherosclerosis development. The molecular pathways impacting hypercholesterolemia and whether this potentially implies direct cross-talks between KCs and hepatocytes⁵ and/or the diminished capacity of MoKCs to eliminate modified lipoproteins with atherogenic potential remain to be defined.

Together, our data highlight the possibility that the actual development of nanoparticle-based therapeutic strategies to target macrophages within atherosclerotic lesions may also present a great deal of interest to preserve KCs homeostasis and function in the liver of hypercholesterolemic patients. In that respect, it would be highly relevant to assess in preclinical models the beneficial actions on KCs of nanoparticle-mediated delivery of functional miRNA^{40,41} or synthetic LXR agonists^{42,43} that have been shown to promote cholesterol efflux from foamy macrophages, or alternatively nanoparticle-based approaches to scavenge ROS⁴⁴.

Methods

Experimental animals, diets and treatments.

All animal procedures were performed in accordance with the guidelines of the Charles Darwin ethics committee on animal experimentation and with the French ministry of agriculture license. This investigation conformed to the European directive 2010/63/EU revising directive 86/609/EEC on the protection of animals used for scientific purposes.

Animals were on a C57BL/6J background. UBC-GFP (C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J) mice, Ccr2^{-/-} (B6.129S4-Ccr2^{tm1lfc}/J) mice, homozygous Cd207-DTR (B6.129S2-Cd207^{tm3}(DTR/GFP)Mal/J) mice and LDLr^{-/-} (B6.129S7-Ldl^{rtm1}Her/J) mice were from the Jackson Laboratory. LDLr^{-/-} were bred in-house to Ccr2^{-/-} animals and Cd207-DTR. Cd68-hBCL2 mice previously generated by our team³⁴ were bred in-house to Ccr2^{-/-} animals. The mice were housed in standard cages at 21 °C and under a 12:12 h light/dark cycle with ad libitum access to water and food. Hypercholesterolemia was induced in LDLr^{-/-} mice by feeding the animals with a chow diet (SAFE A04, Augy, France,) containing 1% cholesterol (HC diet). For studies with ezetimibe, the animals were fed with powdered chow diet (SAFE A04) supplemented or not with 0.005% ezetimibe for 4 days and then switched to powdered chow or HC diets supplemented with 0.005% ezetimibe (Bertin Pharma, France) for 4 days. For CSF1R blocking experiments, 100 mg/kg of PLX3397 or vehicle (0,5% HPMC, 1% Tween 80, 2,5% DMSO) was given to mice by gavage every day from day 0 to day 2 of HC diet feeding. Mice were euthanized and analyzed on day 3.

Blood, cell-sorted and tissue lipid analyses

Blood samples were collected with heparin-coated capillaries by retro-orbital bleeding in EDTA-containing tubes under isoflurane anesthesia (2% isoflurane/0.2 L O₂/min). Plasma samples were stored frozen at -80°C. Plasma total and free cholesterol levels were determined using commercial kits (Diasys). Quantification of cholesterol and cholesteryl ester species in sorted cells or liver tissue was performed by LC-ESI/MS/MS using a Prominence UFLC and a QTrap 4000 mass spectrometer (ICANalytics core facility of the institute of Cardiometabolism and Nutrition (IHU-ICAN, ANR-10-IAHU-05). Briefly, cell pellets or liver tissues resuspended in methanol 70% and homogenized were supplemented with internal standards: CE(18:1)_{d7} and cholesterol_{d7}. Lipids were extracted according to a modified Bligh and Dyer method in methanol/CHCl₃ (2:1) and HCl 0.01N. Phase separation was triggered by addition of CHCl₃ and H₂O. the lower phase was dried and resuspended in LC/MS compatible solvent. Samples were injected to a Ascentis C18 column. Mobile phase A consisted of ACN/H₂O (60:40), 10mM ammonium formate, 0.1% formic acid and mobile phase B of ISP/ACN (90:10), 10mM ammonium formate, 0.1% formic acid. Lipid species were detected using scheduled multiple reaction monitoring (sMRM).

Liver processing and cell suspensions preparation

Mice were euthanized by cervical dislocation. Immediately after, livers were perfused through the portal vein with 1 mL of PBS, followed by 2 mL (1.5ml/min) perfusion with HBSS containing collagenase D (2.5 mg/mL, Sigma). Livers were removed and incubated for 30 min at 37°C under gentle agitation with HBSS containing collagenase D (2.5 mg/mL, Sigma). Cell suspensions were passed through a 100 µm cell strainer before staining. All subsequent procedures were performed at 4°C.

Flow cytometry

Antibodies were purchased from BioLegend, Thermo Fisher Scientific, R&D Systems and BD Biosciences. Cell suspensions were pre-incubated 20 mins with anti-mouse CD16/32 antibody (93, biolegend) to block Fc receptors. The following markers and clones were used: CD11c (N418), CD11b (M1/70), CD45 (30-F11), Ly-6C (HK1.4), CD64 (X54-5/7.1), VSIG4 (NLA14), CLEC4F (AF2784), TIMD4 (RMT4-54), CLEC2 (17D9), Ki-67 (B56), TCRb (H57-597), CD8a (53-6.7), B220 (RA3-6B2), MHC-II (M5/114.15.2), Nk1.1 (PK136), CD4 (RM4-5), CD36 (BB515), and Ly6G (1A8). Cells were stained with appropriate antibodies for 30 min on ice. Draq7 (BioLegend) was used to exclude dead cells. Intracellular Ki-67 staining was performed using the Foxp3 staining kit from Thermo Fisher Scientific. Bodipy 493/503 staining was performed on cells fixed using the Cytofix/Cytoperm™ kit from BD Biosciences. Mitosox staining was performed before extracellular staining according to manufacturer's instructions (MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, Thermo Fisher Scientific). To calculate absolute cell counts, a fixed number of nonfluorescent beads (10,000 10-µm polybead carboxylate microspheres from Polysciences) was added to each tube. The formula number of cells = (number of acquired cells x 10,000) / (number of acquired beads) was used. Cell counts were finally expressed as a number of cells per milligram of tissue. Data were acquired on a BD LSRFortessa flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (Tree Star). The dimensionality reduction algorithm tSNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) was run using the plugin integrated in FlowJo. KCs cell sorting (EmKCs CD45⁺CLEC2⁺TIMD4⁺CD31⁻ and MoKCs CD45⁺CLEC2⁺TIMD4⁻CD31⁻) was performed on a BD FACSAria II cell sorter.

Microscopy

After liver removal, 3-5 mm slices of tissue were fixed by immersion in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24h at 4°C, washed in PBS, and further incubated 24h in 30% sucrose. Samples were embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek) and frozen using isopentane and liquid nitrogen. 8 µm slices were cut on a cryostat (Leica CM 1900), rehydrated in PBS for 5 mins, and incubated with 0.5% triton and 3% bovine serum albumin for 30 mins at room temperature. Tissue sections were labeled overnight at 4°C in a humid chamber with goat anti-mouse CLEC4F (AF2784, R&D systems) and rat anti-mouse/human CD324 (DECMA-1, BioLegend) antibodies, washed with PBS, and further incubated for 1h at room temperature with cy3 AffiniPure F(ab')₂ fragment rabbit anti-goat IgG and alexa fluor 647 AffiniPure donkey anti-rat IgG secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). Slides were mounted with Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories), imaged with a Zeiss

Axiolmager M2 microscope (Carl Zeiss) using Zen software. For lipid imaging of liver tissue, LDLr^{-/-} mice fed a chow diet or HC diet for 4 days were anesthetized using Isoflurane and injected intravenously with 5 µg anti-mouse TIM4-APC antibody (RMT4-54, BioLegend). They were then euthanized 5 minutes after injection by cervical dislocation and perfused through the portal vein with PBS and then with 4% ice-cold PFA. Livers were harvested, lobes separated and incubated overnight at 4°C in a fixation/permeabilization buffer (BD Biosciences) diluted 1:4. Tissue samples were washed thoroughly with PBS before imaging. The two-photon laser-scanning microscopy (TPL SM) set-up used was a 7MP (Carl Zeiss) coupled to a Ti: Sapphire Crystal multiphoton laser (ChameleonU, Coherent), which provides 140-fs pulses of near-infrared light, selectively tunable between 680 and 1050 nm and an optical parametric oscillator (OPO-MPX, Coherent) selectively tunable between 1,050 and 1,600 nm. The NLO and the OPO beams were spatially aligned and temporally synchronized using a delay line (Coherent) allowing Coherent anti-stoke Raman Scattering (CARS) imaging approach. The excitation wavelength was 820 nm for the NLO beam and 1070 nm for the OPO beam to detect the vibrational signature of lipid rich structures at a frequency of 2850 cm⁻¹ with an emission wavelength at 665 nm. The system included a set of external nondescanned detectors in reflection with a combination of a LP-600-nm dichroic mirror (DM) followed by a LP-645-nm DM with 624-/40-nm emission filter (EF) and a LP-462-nm DM with 417-/60-nm emission filter (EF), LP-500-nm DM with 480-/40-nm EF, LP-550nm DM with 525-/50-nm and 575/50 nm EFs. Images were performed directly on the whole liver lobe with a water immersion objective, plan apochromat ×20 (numerical aperture = 1). Mask rendering and treatment were done using Imaris software (Bitplane).

Total body irradiation and bone marrow transplantation

Bone marrow cells were harvested from UBC-GFP donor female mice by gently flushing their femurs. 10 million cells were injected intravenously into 3 Gy irradiated Cd68-hBCL2 x Ccr2^{-/-} or Ccr2^{-/-} female mice. A three weeks-recovery period was observed to ensure donor bone marrow engraftment and blood monocytes reconstitution. To ensure induction of hypercholesterolemia, mice were then administered intravenously 10¹¹ vector genome copies of a recombinant adeno-associated virus pAAV9-TBG_D377YmPcsk9 encoding the gain-of-function form of murine PCSK9³⁵ under the liver specific control of the TBG promoter (virus production by VectorBuilder Inc, USA). Mice were fed 7 days later with HC diet for three weeks before sacrifice.

Diphtheria toxin (DT) mediated depletion of KCs in Cd207-DTR mice

Kupffer cells were depleted following two intraperitoneal DT (Sigma) injection (2 x 1µg, 6 hours apart) in homozygous Cd207-DTR X LDLr^{-/-} mice. heat-inactivated DT (bDT, boiled 25 mins) was used as control.

In vivo lipid uptake blocking by CD36 neutralizing antibodies

Chow fed LDLr^{-/-} mice were fasted during the day and administered i.v. 50 µg of anti-CD36 monoclonal antibody (MF3, thermoFisher Scientific) or 50 µg of rat IgG2a isotype (thermoFisher Scientific) before given access to HC diet. Antibody injections were repeated the day after, 1 hour before sacrifice.

In vivo Oxidized-LDL uptake

LDL were isolated from human plasma by sequential ultracentrifugation in the density range of $1.019 < d < 1.063$ g/ml, dialyzed against PBS and filter-sterilized. Oxidation was initiated by dialysis of the LDL preparation against a 5µM copper sulfate solution at 37°C. After an overnight incubation, the oxidation reaction was stopped by extensive dialysis against PBS-EDTA 0.1 mM. Changes in the electrophoretic mobility of LDL lipoproteins after oxidation was monitored on agarose gel (hydrogel LIPO + Lp(a) K20, Sebia). Oxidized-LDL (oxLDL) were then incubated with BODIPY 493/503 (4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentaméthyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène, ThermoFischer Scientific) (100 µM final) at 37°C for 30 mins and then overnight at 4°C. Free bodipy was removed by passing the oxLDL preparation through a PD-10 column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) using PBS as buffer. Finally, bodipy-labeled oxLDL were concentrated using Spin-X UF concentrator (Corning) to approximately 2 mg protein/mL. 150 µL of the preparation was injected i.v. into LDLr^{-/-} male mice fed 3 weeks HC diet and switched for one week on chow diet. oxLDL were injected in control mice. Animals were euthanized 1 hour after injection to measure bodipy content of kuppfer cells using flow cytometry.

qPCR analysis

For gene expression analysis on liver tissue, total RNA preparation was performed using the NucleoSpin RNA Plus kit (MACHEREY-NAGEL). cDNA was synthesized using random hexamer and SuperScript III (Thermo Fisher Scientific). For gene expression analysis on sorted cells, total RNA was prepared from 20,000 cells using the RNeasy Plus micro kit (QIAGEN). RNA was reverse transcribed using the SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR analyses using Sybr (LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche) were performed using a LightCycler 480 real-time PCR system and dedicated software (Roche). Initial differences in mRNA quantities were controlled using reference mouse genes 18s, Hprt, Rpl13a, and Nono. Primers sequences are available upon request.

RNAseq on flow cytometry-sorted KCs

Total RNA preparation was performed from 20,000 sorted KCs using the RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen). cDNA libraries were generated using Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). RNA-Seq libraries were sequenced on an Illumina NovaSeq 6000 (40 million reads per sample). RNA-Seq analysis was completed using the Eoulsan pipeline. The STAR index was used to map raw reads to the genome and data normalization was performed with DESeq2. A LIMMA analysis was conducted to select differentially expressed

genes with a 1.3-fold change cutoff between at least two conditions. Adjusted p value for multiple gene testing were used. Annotated genes with a count mean over 100 in at least one condition and a coefficient of variation of more than 0.5 between at least two conditions were retained. GSEA analysis was performed using the Phantasus web platform. The R packages EnhancedVolcano and EnrichR were used for volcano plotting and pathway analyses.

Analysis of aortic lipid lesions

Atherosclerotic lesions were quantified on serial cross sections of the aortic root as previously described⁴⁶. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane (2%), euthanized by cervical dislocation and then perfused with PBS. Hearts were collected, fixed with 4% PFA for 30 minutes followed by overnight incubation in phosphate-buffered 20% sucrose solution at 4°C. Hearts were subsequently embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek). 10 µm thick sections were cut through the proximal aorta, spanning the three cusps of the aortic valves. 3 sections surrounding the valves (40 µm apart) were fixed and stained with oil red O (ORO, 0.3% in triethylphosphate) for 30 minutes and then counterstained with Mayer hematoxylin for 1 minute. Images were captured using a Zeiss AxioImager M2 microscope and plaque area measured with the AxioVision Zeiss software.

Statistical analyses

Statistical significance of differences was performed using GraphPad Prism (GraphPad Software). Two-tailed Student's t test was used to assess the statistical significance of the difference between means of two groups. Experiments were repeated at least twice. Graphs depicted the mean ± SEM. One-way ANOVA and Tukey's or Dunnett post hoc analyses were used for multiple comparison tests. Statistical significance is represented as follows: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

References

1. Ference, B. A. *et al.* Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **38**, 2459–2472 (2017).
2. Que, X. *et al.* Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice. *Nature* **558**, 301–306 (2018).
3. Shearn, A. I. U. *et al.* Bcl-x inactivation in macrophages accelerates progression of advanced atherosclerotic lesions in Apoe(-/-) mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1142–1149 (2012).
4. Bouchareychas, L. *et al.* Promoting macrophage survival delays progression of pre-existing atherosclerotic lesions through macrophage-derived apoE. *Cardiovasc. Res.* **108**, 111–123 (2015).
5. Demetz, E. *et al.* The haemochromatosis gene Hfe and Kupffer cells control LDL cholesterol homeostasis and impact on atherosclerosis development. *European Heart Journal* **41**, 3949–3959 (2020).
6. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
7. Sawai, C. M. *et al.* Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals. *Immunity* **45**, 597–609 (2016).
8. Hoeffel, G. *et al.* C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* **42**, 665–78 (2015).
9. Liu, Z. *et al.* Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. *Cell* **178**, 1509-1525.e19 (2019).
10. Devisscher, L. *et al.* Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool. *Cell. Immunol.* **322**, 74–83 (2017).
11. Tran, S. *et al.* Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* **53**, 627-640.e5 (2020).
12. Remmerie, A. *et al.* Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver. *Immunity* **53**, 641-657.e14 (2020).
13. Seidman, J. S. *et al.* Niche-Specific Reprogramming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immunity* **52**, 1057-1074.e7 (2020).
14. Theurl, I. *et al.* On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat. Med.* **22**, 945–951 (2016).
15. Bleriot, C. *et al.* Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* **42**, 145–58 (2015).
16. Lai, S. M. *et al.* Organ-Specific Fate, Recruitment, and Refilling Dynamics of Tissue-Resident Macrophages during Blood-Stage Malaria. *Cell Reports* **25**, 3099-3109.e3 (2018).
17. Scott, C. L. *et al.* Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun* **7**, 10321 (2016).
18. David, B. A. *et al.* Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice. *Gastroenterology* **151**, 1176–1191 (2016).

19. Bonnardel, J. *et al.* Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity* **51**, 638-654.e9 (2019).
20. Sakai, M. *et al.* Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. *Immunity* **51**, 655-670.e8 (2019).
21. Venkateswaran, A. *et al.* Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXRA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 12097–12102 (2000).
22. Scott, C. L. *et al.* The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity* **49**, 312-325.e5 (2018).
23. Doi, Y. *et al.* Development of complementary expression patterns of E- and N-cadherin in the mouse liver. *Hepatology Research* **37**, 230–237 (2007).
24. Kim, K. *et al.* Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models. *Circ Res* **123**, 1127–1142 (2018).
25. Endemann, G. *et al.* CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* **268**, 11811–11816 (1993).
26. Cheng, C. *et al.* Recognition of lipoproteins by scavenger receptor class A members. *Journal of Biological Chemistry* **297**, 100948 (2021).
27. Wong, H. S. *et al.* Chemokine Signaling Enhances CD36 Responsiveness toward Oxidized Low-Density Lipoproteins and Accelerates Foam Cell Formation. *Cell Reports* **14**, 2859–2871 (2016).
28. Zhang, X. *et al.* Dietary cholesterol drives fatty liver-associated liver cancer by modulating gut microbiota and metabolites. *Gut* **70**, 761–774 (2021).
29. Serbina, N. V. & Pamer, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* **7**, 311–317 (2006).
30. Seimon, T. A. *et al.* Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell metabolism* **12**, 467–82 (2010).
31. Asmis, R. & Begley, J. G. Oxidized LDL Promotes Peroxide-Mediated Mitochondrial Dysfunction and Cell Death in Human Macrophages: A Caspase-3-Independent Pathway. *Circulation Research* **92**, (2003).
32. Sanda, G. M. *et al.* Aggregated LDL turn human macrophages into foam cells and induce mitochondrial dysfunction without triggering oxidative or endoplasmic reticulum stress. *PLoS ONE* **16**, e0245797 (2021).
33. Wang, Y., Wang, G. Z., Rabinovitch, P. S. & Tabas, I. Macrophage Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Atherosclerosis and Nuclear Factor- κ B-Mediated Inflammation in Macrophages. *Circ Res* **114**, 421–433 (2014).
34. Gautier, E. L. *et al.* Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation* **119**, 1795–804 (2009).
35. Bjørklund, M. M. *et al.* Induction of Atherosclerosis in Mice and Hamsters Without Germline Genetic Engineering. *Circ Res* **114**, 1684–1689 (2014).
36. Devries-Seimon, T. *et al.* Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *The Journal of cell biology* **171**, 61–73

(2005).

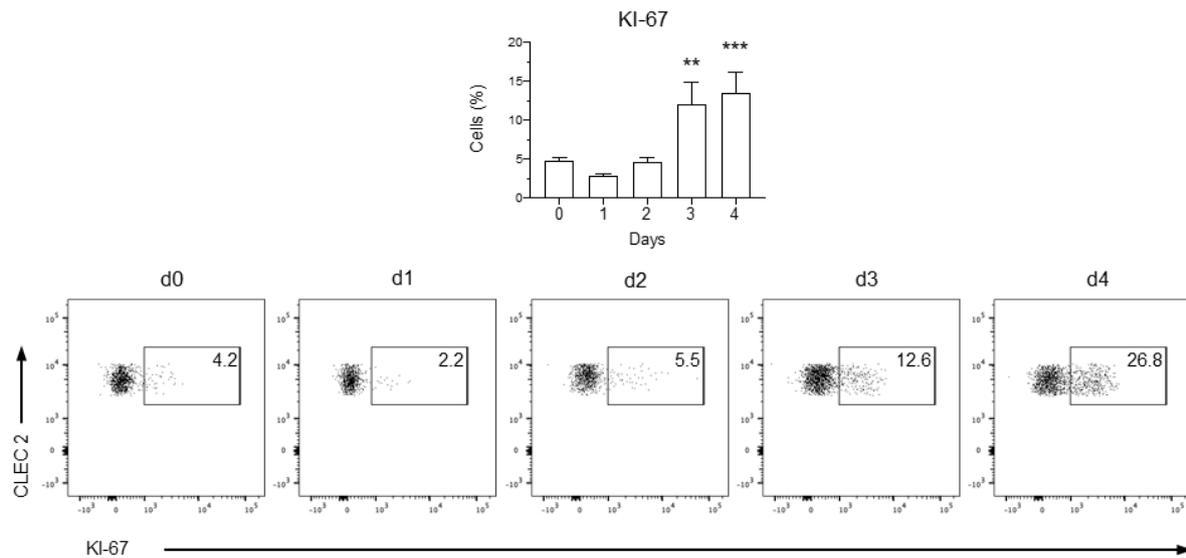
37. Yao, P. M. & Tabas, I. Free Cholesterol Loading of Macrophages Is Associated with Widespread Mitochondrial Dysfunction and Activation of the Mitochondrial Apoptosis Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 42468–42476 (2001).
38. Kunjathoor, V. V. *et al.* Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49982–49988 (2002).
39. Guilliams, M. & Scott, C. L. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nat Rev Immunol* **17**, 451–460 (2017).
40. Nguyen, M.-A. *et al.* Delivery of MicroRNAs by Chitosan Nanoparticles to Functionally Alter Macrophage Cholesterol Efflux *in Vitro* and *in Vivo*. *ACS Nano* **13**, 6491–6505 (2019).
41. Li, C. *et al.* Site-Specific MicroRNA-33 Antagonism by pH-Responsive Nanotherapies for Treatment of Atherosclerosis via Regulating Cholesterol Efflux and Adaptive Immunity. *Adv. Funct. Mater.* **30**, 2002131 (2020).
42. Guo, Y. *et al.* Synthetic High-Density Lipoprotein-Mediated Targeted Delivery of Liver X Receptors Agonist Promotes Atherosclerosis Regression. *EBioMedicine* **28**, 225–233 (2018).
43. Yu, M. *et al.* Targeted Nanotherapeutics Encapsulating Liver X Receptor Agonist GW3965 Enhance Antiatherogenic Effects without Adverse Effects on Hepatic Lipid Metabolism in *Ldlr*^{-/-} Mice. *Adv. Healthcare Mater.* **6**, 1700313 (2017).
44. Wang, Y. *et al.* Targeted Therapy of Atherosclerosis by a Broad-Spectrum Reactive Oxygen Species Scavenging Nanoparticle with Intrinsic Anti-inflammatory Activity. *ACS Nano* **12**, 8943–8960 (2018).
45. Jourden, L., Bernard, M., Dillies, M.-A. & Le Crom, S. Eoulsan: a cloud computing-based framework facilitating high throughput sequencing analyses. *Bioinformatics* **28**, 1542–1543 (2012).
46. Huby, T. *et al.* Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J. Clin. Invest.* **116**, 2767–2776 (2006).

Acknowledgment:

This work was supported by grants to T.H. from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE14-0044, ANR-21-CE14-0067-01), from the Fondation de France and Sorbonne Université Emergence programme.

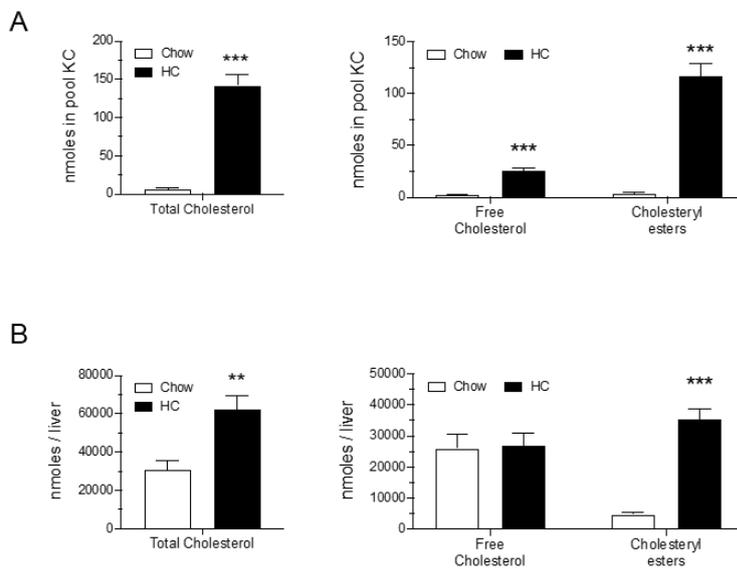
Ethics declarations

Supplementary information



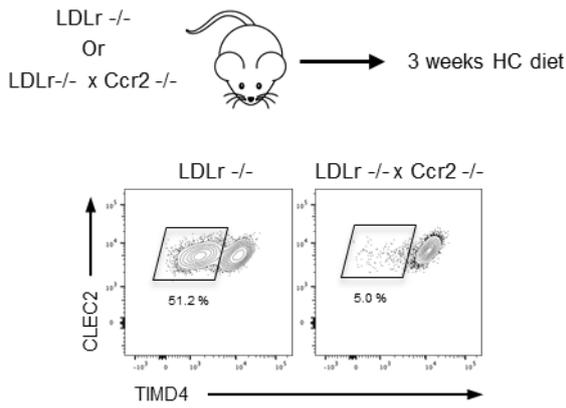
Extended data Fig. 1

In support of Fig1_Percentage of KI-67⁺ cells among Clec2⁺ KCs of LDLr^{-/-} mice fed chow or HC diet for 1, 2, 3 or 4 days. Representative FACS plots for each day are shown.



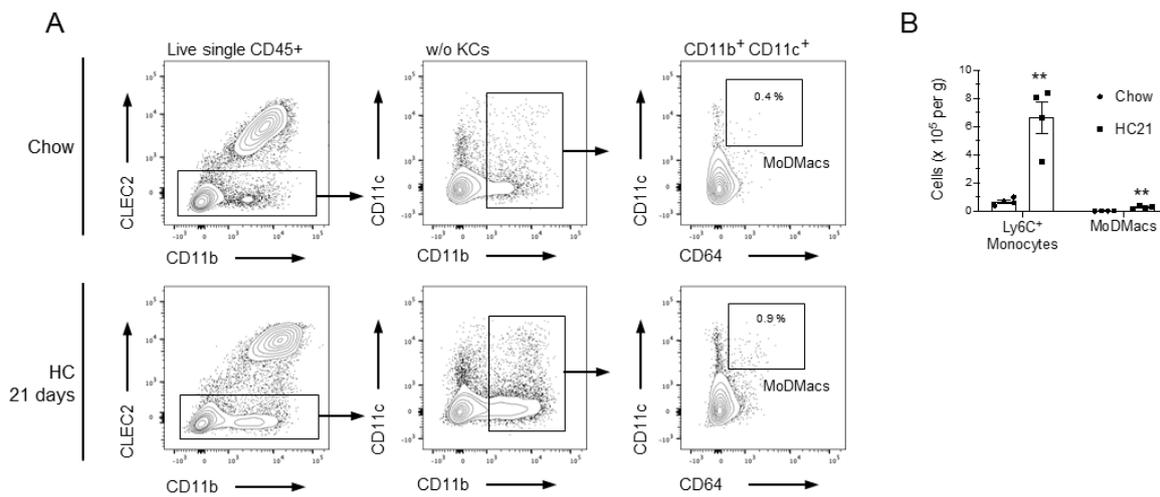
Extended data Fig. 2

In support of Fig2_(A) Calculated amount of total cholesterol and of free and cholesteryl-esters present in the KC pool of chow- and HC-fed (4 days) LDLr^{-/-} mice. (B) Calculated amount of total cholesterol and of free and cholesteryl-esters present in the liver of chow- and HC-fed (4 days) LDLr^{-/-} mice.



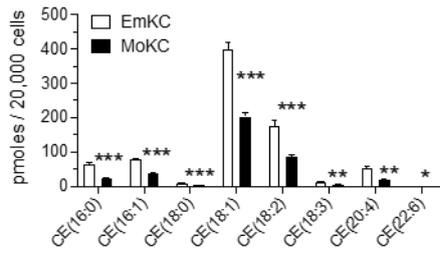
Extended data Fig. 3

In support of Fig4_ Representative FACS plots showing the proportion of TIMD4⁺ cells among CLEC2⁺KCs in LDLr^{-/-} and LDLr^{-/-} x Ccr2^{-/-} mice subjected to hypercholesterolemia for 3 weeks.



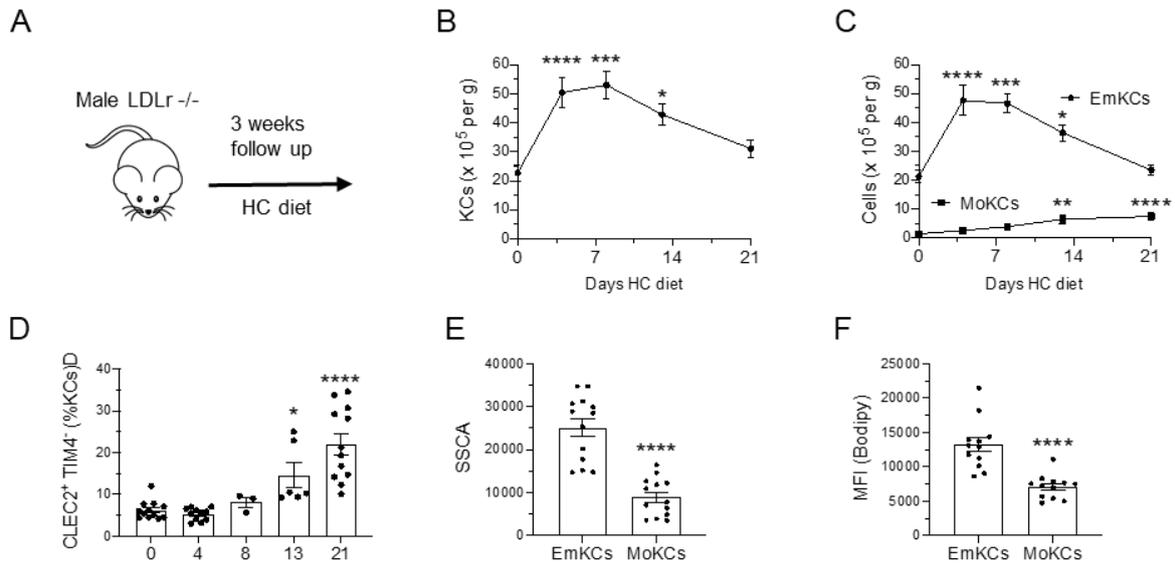
Extended data Fig. 4

In support of Fig4_(A) Representative FACS plots showing the gating strategy used to discriminate MoDMacs in livers of LDLr^{-/-} mice fed chow or HC diet for 21 days. (B) Comparative absolute numbers of Ly6C⁺ monocytes and MoDMacs found in the livers of the mice under these feeding conditions are shown.



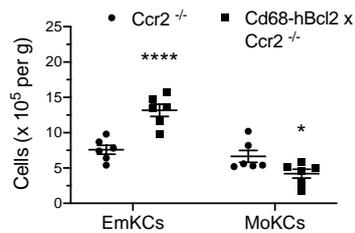
Extended data Fig. 5

In support of Fig4_Major cholesteryl-esters species quantified in sorted EmKCs and MoKCs from LDLr^{-/-} mice fed HC diet for 3 weeks.



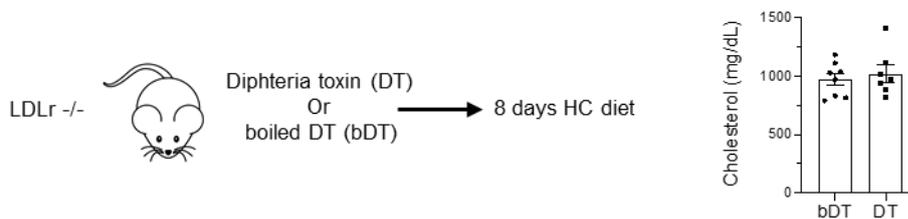
Extended data Fig. 6

In support of Fig4_(A) Experimental plan (B) Total KC numbers were determined by flow cytometry before and 4, 8, 13 and 21 days after induction of hypercholesterolemia. (C) EmKCs and MoKCs numbers determined by flow cytometry before (n=12) and at 4 (n=11), 8(n=4), 13(n=6) and 21 (n=12) days after induction of hypercholesterolemia. Indicated p values correspond to significant statistical differences to day 0. (D) Quantification of CLEC2+TIMD4- KCs frequency among KCs. (E) Granularity and (I) lipid content (bodipy) of EmKCs and MoKCs of mice fed HC diet for 3 weeks.



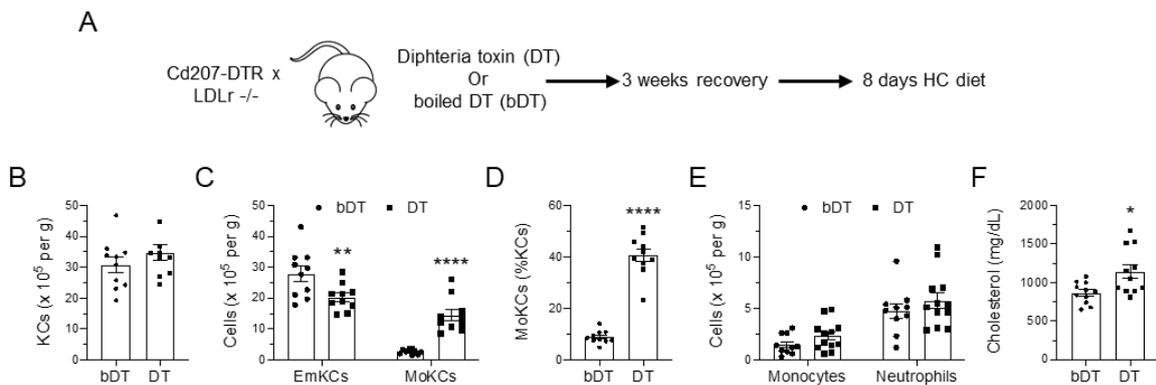
Extended data Fig. 7

In support of Fig5_Absolute EmKC and MoKC numbers measured in *Ccr2*^{-/-} and *Cd68-hBCL2* × *Ccr2*^{-/-} chimeric mice fed HC diet for 3 weeks.



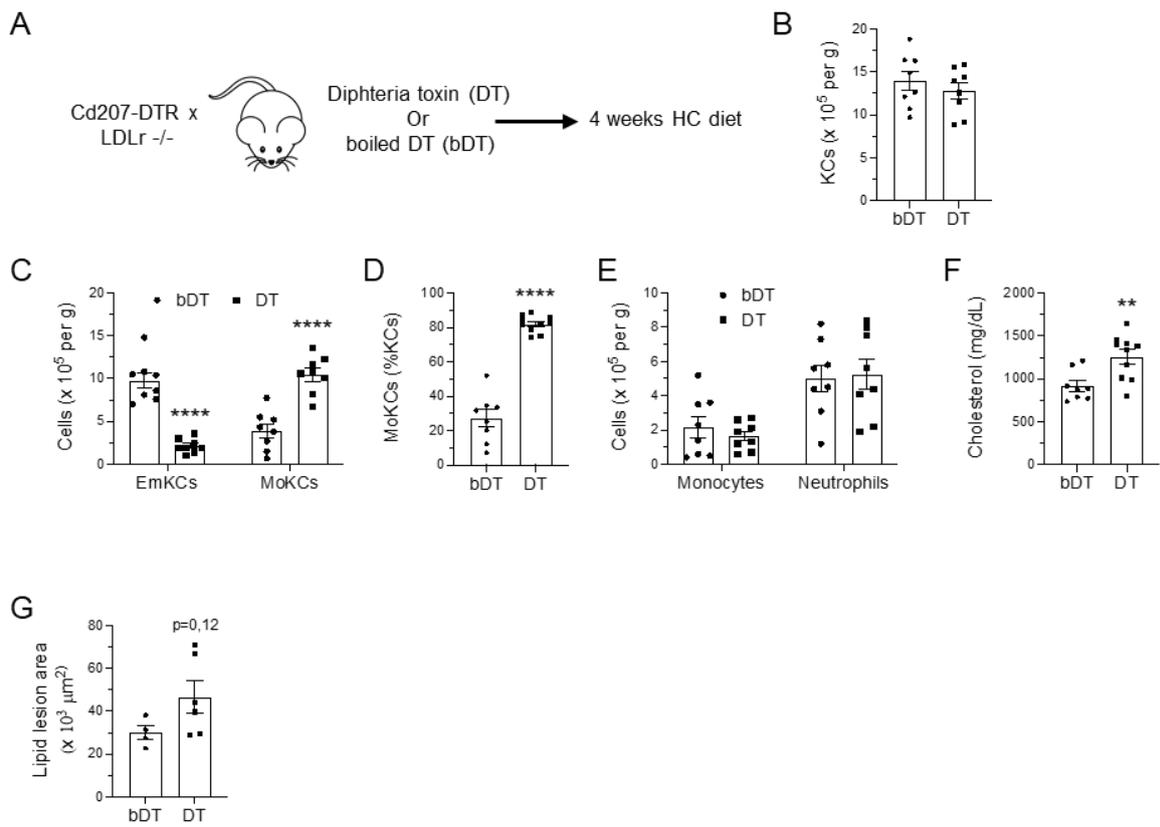
Extended data Fig. 8

In support of Fig6_Absence of plasma cholesterol raising effect in LDLr^{-/-} mice injected with DT and fed HC diet for 8 days as compared to bDT-treated mice.



Extended data Fig. 9

In support of Fig6_(A) Experimental strategy with a 3 weeks recovery period post DT injection. (B) Total KC and (C) EmKCs and MoKCs absolute numbers in livers of Cd207-DTR × LDLr^{-/-} male mice after 8 days of HC diet and injected either with bDT (n = 10 mice / group). (D) Percentage of MoKCs (E) Absolute numbers for liver monocytes and neutrophils (F) Plasma cholesterol concentrations after 8 days HC diet feeding.



Extended data Fig. 10

In support of Fig6_(A) Experimental strategy in Cd207-DTR x LDLr^{-/-} male mice to deplete EmKCs in the context of hypercholesterolemia for 4 weeks. (B) Total KC and (C) EmKCs and MoKCs absolute numbers in livers of Cd207-DTR x LDLr^{-/-} male mice after 4 weeks of HC diet and injected either with bDT (n=8) or DT (n=8). (D) Percentage of MoKCs. (E) Absolute numbers for liver monocytes and neutrophils. (F) Plasma cholesterol concentrations after 4 weeks HC diet feeding. (G) Quantification of lipid lesions by ORO staining of aortic root sections of Cd207-DTR x LDLr^{-/-} male mice after 4

DISCUSSION

En tant que problème majeur de santé publique, les conséquences de l'hypercholestérolémie sur le développement de la plaque d'athérosclérose, et notamment sur la transformation des macrophages en cellules spumeuses au sein de celle-ci, ont fait l'objet de nombreuses études depuis des dizaines d'années. Mes travaux de thèse montrent que l'hypercholestérolémie perturbe aussi l'homéostasie des ResMacs du foie. Ils se chargent fortement en lipides et leur pool est modulé menant à l'établissement de MoKCs. De plus, si un rôle métabolique des KCs a été récemment observé dans les contextes de la NASH et de l'obésité, nos travaux suggèrent aujourd'hui qu'elles participent à l'homéostasie du cholestérol et pourraient contribuer au développement de l'athérosclérose en contexte d'hypercholestérolémie.

Dans cette partie, je propose de discuter de plusieurs notions issues de mes résultats expérimentaux. Les figures en références sont celles de l'article rédigé.

I. Prolifération des EmKCs

En réponse à l'induction de l'hypercholestérolémie chez la souris, les EmKCs s'adaptent et leur densité tissulaire s'accroît de 2 à 3 fois en quelques jours. Nous avons montré que cette augmentation est due à la prolifération des cellules et que celle-ci était dépendante du récepteur kinase CSF1R (Figure 1). De plus, nous avons observé une augmentation progressive de l'expression de son ligand CSF1 au niveau hépatique au cours de l'induction de l'hypercholestérolémie, suggérant l'implication de l'axe CSF1-CSF1R dans la prolifération de EmKCs. Comme il l'a été démontré dans un contexte de déplétion (Bonnardel et al. 2019), nous pourrions supposer plus spécifiquement que les LSEC et les HSC soient à l'origine de la production de CSF1 et de la prolifération des EmKCs au cours de l'hypercholestérolémie. Les mécanismes à l'origine de leur activation restent à définir.

Toutefois, même si le CSF1 est le facteur de croissance majeur des macrophages, nous avons envisagé que d'autres candidats puissent participer à cette prolifération. Notamment l'IL34, un autre ligand de CSF1R produit par les HSC (Bonnardel et al. 2019), mais nous n'avons pas observé d'augmentation significative de sa production

en réponse à l'hypercholestérolémie. D'autre part, plusieurs données nous ont également orienté vers un rôle potentiel de l'érythropoïétine (EPO) comme signal de prolifération. En effet, après la mise sous régime des souris *Ldlr^{-/-}*, nous avons observé une signature génique dans les EmKCs qui suggère une érythrophagocytose accrue dans ces conditions d'hypercholestérolémie. Cet effet s'accompagne d'une augmentation d'EPO circulante et d'une érythropoïèse splénique accrue (données non montrées). Or, il a été identifié que les KCs exprimaient le récepteur à l'érythropoïétine (EPO-R) et que son activation par l'EPO entraînait leur prolifération (Gilboa et al. 2017). Nous avons donc testé l'implication de l'EPO comme signal de prolifération des KCs par injections d'un anti-EPO après la mise sous régime des souris (données non montrées). Les résultats obtenus semblent toutefois réfuter un rôle de l'EPO dans la réponse proliférative des KCs à l'hypercholestérolémie. De plus, grâce à nos données de RNAseq nous avons identifié un autre candidat, le facteur de transcription *Bhlhe40*. Il fait partie des top gènes surexprimés dans les EmKCs après l'induction de l'hypercholestérolémie, il interagit avec le *Srebf1* et a été décrit comme induisant la prolifération des grands macrophages péritonéaux et des macrophages alvéolaires en réponse à l'IL4 (Jarjour et al. 2019; Rauschmeier et al. 2019). Au cours de nos études préliminaires, nous avons utilisé la souris *Bhlhe40^{flox/flox}* fournie par le laboratoire de Brian T. Edelson (Huynh et al. 2018) que nous avons croisée en fond *Lysm-cre* puis mise sous régime riche en cholestérol. La délétion de *Bhlhe40* n'a pas eu d'effet sur la prolifération des EmKCs, ni sur l'augmentation du pool écartant à priori un rôle de ce facteur dans la réponse proliférative des EmKCs à l'hypercholestérolémie.

II. Cellules spumeuses

Localisées dans les sinusoides, au plus proche contact des lipoprotéines qui circulent dans le plasma, les EmKCs en tant que phagocytes se chargent fortement en lipides et notamment en CE. Associé à cela un équilibre se met en place où nous observons dans les EmKCs une répression des voies de synthèse du cholestérol et en parallèle un profil transcriptomique ressemblant à celui des cellules spumeuses de la plaque. L'implication du CD36 dans la formation de ces cellules granuleuses gorgées de lipides suggère que les lipoprotéines prises en charge soient modifiées/oxydées (Figure 2). Un dosage des LDLox dans le plasma des souris est à prévoir.

CD36 a récemment été décrit comme ayant un rôle métabolique dans les KCs de souris obèses. Les auteurs mentionnent l'existence de deux populations de KCs nommées KC1 et KC2 identifiées grâce à des marqueurs spécifiques comme CD36 que les KC2 exprimeraient plus fortement (Blériot et al. 2021). Dans ce contexte et alors que CD36 semble jouer un rôle dans les KCs au cours de l'hypercholestérolémie, nous avons évalué la présence de ces deux populations dans le foie des souris *Ldlr*^{-/-}. Par cytométrie en flux, nous avons observé une expression globalement homogène du CD36 dans les EmKCs, avant et au cours de l'hypercholestérolémie (données non montrées). Nos résultats ne sont pas en accord avec une présence de KC2 qui exprimeraient plus fortement le CD36. De plus notre stratégie d'identification nous permet d'exclure les cellules endothéliales et donc les potentiels doublets cellulaires qui alimentent la controverse (Hume, Offermanns, et Bonnavion 2022). Bien qu'on pourrait envisager de tester d'autres marqueurs de KC2 (ESAM, CD206), nous n'avons à ce jour pas mis en évidence de populations KC1/KC2, telles que décrites par Blériot, dans notre contexte d'hypercholestérolémie.

Nous avons par la suite cherché à déterminer si d'autres mécanismes conduisaient à cette surcharge lipidique, s'ils impliquaient des récepteurs spécifiques favorisant la phagocytose de lipoprotéines plasmatiques, ou/et s'ils reposaient sur un phénomène de captation sélective du cholestérol impliquant SR-B1 par exemple. Cependant, le gène *Scarb1* codant pour la protéine SRB1 est réprimé dans nos conditions et il nous a semblé inutile de poursuivre les investigations dans ce sens.

Néanmoins, l'analyse transcriptomique réalisée au laboratoire ainsi que des données de la littérature, orientent vers un autre candidat. En effet le gène *Colec12* (collectin subfamily member 12), un récepteur scavenger qui a été impliqué dans la phagocytose de lipoprotéines oxydées ou acétylées (Ohtani et al. 2001), se trouve être surexprimé dans les EmKCs dans nos conditions d'hypercholestérolémie. Afin d'évaluer la potentielle implication de COLEC12 dans la prise en charge des lipides par les KCs, nous avons cherché à inhiber sa fonction avec un anticorps neutralisant. Cependant, le seul anticorps disponible n'a pas montré de marquage extracellulaire de COLEC12 sur les EmKCs vivo suggérant qu'il n'était pas utilisable comme anticorps neutralisant.

Enfin, nos données de RNAseq permettent de mettre en évidence l'activation de gènes induits par LXR dans les EmKCs en condition d'hypercholestérolémie. Nous

retrouvons une up-régulation de l'anti-apoptotique CD5L et de gènes impliqués dans l'efflux de cholestérol comme la LIPA, une lipase qui clive les CE dans les lysosomes et ABCA1 un transporteur de cholestérol. Ces régulations, caractéristiques des macrophages spumeux de la plaque d'athérosclérose, pourraient favoriser l'efficacité de la réponse des EmKCs à l'induction de l'hypercholestérolémie.

III. Souffrance cellulaire

La charge en lipides dans les EmKCs est majoritairement sous forme de CE. Cependant, nous observons aussi une augmentation des formes libres de cholestérol. C'est un signal décrit dans les macrophages de la plaque comme pouvant favoriser l'apoptose par induction d'un stress du RE (Devries-Seimon et al. 2005), ainsi qu'un stress oxydatif associé à une dysfonction mitochondriale (Yao et Tabas 2001). Dans nos conditions expérimentales, nous observons une augmentation du stress oxydatif au fil du temps associée à une diminution drastique de la population d'EmKCs (Figure 4E et 5A). D'autres marqueurs de souffrance des EmKCs pourraient être mis en évidence sur la cinétique réalisée. Notamment en évaluant l'apoptose des EmKCs par la quantification des gènes associés à l'apoptose, tels que *Chop*, *Map3k8* ou *Nos2*, dans les EmKCs triées. Nous pourrions aussi réaliser par imagerie un marquage des EmKCs couplé à un marquage TUNEL afin de détecter la fragmentation de l'ADN générée au cours de l'apoptose dans ces cellules. La présence de KCs apoptotiques par cette approche pourrait toutefois s'avérer assez difficile à réaliser.

La mort des EmKCs a été décrite dans divers contextes, de déplétion à la DT avec les modèles murins transgéniques DTR (Sakai et al. 2019; Scott et al. 2016; Tran et al. 2020), ou bien pathologiques (Blériot et al. 2021; Lai et al. 2018; Remmerie et al. 2020; I. Theurl et al. 2016; Tran et al. 2020), comme libérant un espace au sein de la niche permettant le recrutement de monocytes et l'établissement de MoKCs. Nous retrouvons ce phénomène dans notre contexte d'hypercholestérolémie où nous observons l'augmentation du nombre de MoKCs de façon concomitante à la perte des EmKCs (Figure 4E). Les interactions cellulaires, au sein de la niche, à l'origine de la modification du pool de KCs ont été décrites dans des contextes de DT où la déplétion des EmKCs est quasi-totale, rapide et entraîne une inflammation transitoire (Bonnardel et al. 2019; Sakai et al. 2019). Une mise au point du tri des différentes cellules de la

niche n'a pas encore été menée par l'équipe à ce jour, mais cela pourrait s'avérer intéressant. En effet, nous pourrions essayer d'observer si une augmentation de TNF et/ou d'IL1 est perceptible au sein des EmKCs comme un signal d'activation des LSEC et HSC pour qu'elles produisent les chimiokines et protéines d'adhésion nécessaires au recrutement des monocytes. Enfin, nous pourrions mesurer l'activation des différentes voies de signalisations, par les hépatocytes, les LSEC et les HSC, essentielles à la différenciation du monocyte en moKC dans le contexte de l'hypercholestérolémie.

Néanmoins, nous avons pu valider grâce au modèle *Ccr2*^{-/-} que le recrutement de MoKCs était dépendant de l'axe CCL2-CCR2 (Figure Suppl 3). Il est important de préciser que l'état de la niche (en termes d'espace libre et de disponibilité des facteurs environnants) prédispose l'arrivée de MoKCs (Guilliams et Scott 2017). En effet, dans un modèle *DTR X Ccr2*^{-/-}, alors que la niche se vide brutalement, l'absence de signalisation CCR2 est détournée pour permettre son maintien (Bonnardel et al. 2019) et c'est une donnée que l'on retrouve dans notre contexte (données non montrées). De plus, les résultats que l'on observe dans le modèle *CD68-hBcl2* renforce ce « modèle de niche » proposé par Guilliams et Scott car limiter l'apoptose des EmKCs en surexprimant l'anti-apoptotique *Bcl2* rend la niche moins accessible aux MoKCs (Figure Suppl 7).

Parmi les mécanismes sous-jacents conduisant à la mort des EmKCs, nous pourrions imaginer une perturbation des voies d'autophagie, un processus cellulaire hautement conservé de dégradation et de recyclage du matériel intracellulaire vieillissant ou endommagé et notamment les lipides accumulés (Evans et al. 2017; Levine et Kroemer 2008). De plus, l'érythrophagocytose augmentée (suggérée par nos données non montrées) associée à la charge lipidique au sein des EmKCs pourraient conduire à leur mort par ferroptose, un mécanisme au cours duquel le fer intracellulaire entraîne la formation de lipides peroxydés, létales pour la cellule.

IV. Dimorphisme sexuel?

Les niches hépatiques des souris mâles et femelles semblent réagir légèrement différemment à l'hypercholestérolémie induite par le régime. En effet, la perte accélérée et plus forte des EmKCs chez la femelle coïncide avec l'établissement plus

rapide et massif de MoKCs (Figure 4E et Suppl 6C). Cette différence pourrait être expliquée par le nombre total de KCs différent en condition basal entre les deux sexes. Malheureusement, parmi les publications que j'ai pu étudier, aucune ne permet d'identifier une réponse dimorphique au niveau des KCs dans d'autres contextes pathologiques et de pouvoir comparer avec nos résultats. Les données sont majoritairement en pourcentage, le sexe des animaux non précisé ou bien les données mâles et femelles sont regroupées au sein d'une même expérience et enfin les protocoles expérimentaux trop éloignés du nôtre donnant des rendements bien différents en terme de nombre de KCs.

Néanmoins, en se basant sur nos résultats, nous observons, en comparaison aux mâles, que le foie des souris femelles compte moins d'EmKCs à l'état basal et après prolifération et qu'elles semblent moins bien gérer l'hypercholestérolémie. En effet, chez ces souris, plus petites que des mâles au même âge et pour un influx de cholestérol similaire, la charge de lipides moyenne au sein des EmKCs est plus importante car à répartir dans moins de cellules ce qui pourrait expliquer une fragilité cellulaire accrue, une apoptose accélérée et une niche plus accessible aux MoKCs qui s'établissent plus massivement que chez les mâles.

Il serait intéressant de mener des études de souffrance cellulaire (mitosox, apoptose, ROS) sur la cinétique des EmKCs mâles afin d'évaluer si elle est plus faible ou avec une cinétique différente que celles observées chez les femelles ce qui pourrait confirmer cette hypothèse.

V. EmKCs et MoKCs : similitudes et différences

En conditions pathologiques, les ResMacs et les macrophages dérivés des monocytes semblent posséder des différences phénotypiques et fonctionnelles. C'est le cas pour la population de macrophages alvéolaires au cours d'infections pulmonaires (Aegerter et al. 2020). Dans le foie, il existe des différences transcriptomiques entre les deux populations et les MoKCs n'expriment pas la totalité des gènes clés des EmKCs, notamment le récepteur de corps apoptotiques TIM4 (Scott et al. 2016; I. Theurl et al. 2016; Tran et al. 2020). Il a été observé également que les moKCs ont une capacité de phagocytose bactérienne *in-vitro* qui semble plus faible que les EmKCs ce qui suggère des différences fonctionnelles (Scott et al. 2016). Par ailleurs, un impact délétère des moKCs a été révélé *in-vivo* au cours de la NASH (Tran et al. 2020). Dans

notre contexte d'hypercholestérolémie, nous retrouvons des différences notamment par la différence de prise en charges des lipides (Figure 4I). Elle peut être expliquée par l'expression plus faible, dans les MoKCs, de gènes qui codent pour des récepteurs scavengers, comme le *CD36* et *Colec12*.

Contrairement aux EmKCs soumises à un stress oxydatif plus important (Figure 5B), les MoKCs moins stressées et dans un état hyper-prolifératif (Figure 4G), sembleraient avoir un phénotype qui leur conférerait un avantage pour se maintenir dans le tissu comme il l'a été reporté dans le contexte de NASH (Tran et al. 2020).

Cependant, les MoKCs semblent avec le temps pouvoir se rapprocher de la signature génique des EmKCs. C'est ce qui a été démontré après une délétion totale des EmKCs à la DT (Scott et al. 2016) ou après régression de la NASH (Tran et al. 2020) où les MoKCs générées acquerraient un profil génique hautement homologue aux EmKCs, notamment avec l'expression de TIM4 pour une partie de la population. A la suite d'une hypercholestérolémie et retour à une normocholestérolémie en plaçant les animaux sous régime normal (données non montrées), nous observons que les MoKCs générées se maintiennent et ont tendance à se rapprocher d'un phénotype de type EmKCs avec la perte du profil hyper-prolifératif et l'acquisition (partielle) de certains marqueurs (VSIG4 et TIM4). Leurs capacités fonctionnelles, une fois l'homéostasie retrouvée, n'ont toutefois pas été évaluées.

VI. Modification du pool et impact physiopathologiques

Les différences phénotypiques entre les EmKCs et les MoKCs dans un contexte d'hypercholestérolémie suggèrent que les EmKCs auraient un rôle bénéfique dans le développement de la pathologie. C'est ce que nous avons montré en utilisant le modèle *CD207-DTR* où l'on observe une augmentation de la cholestérolémie lorsque les EmKCs ont été déplétées (Figure 6). Notons que les EmKCs restantes après l'injection de DT ont surement dû proliférer et la mise sous régime riche en cholestérol a dû renforcer ce processus ce qui expliquerait la présence d'EmKCs dans le foie des souris au moment du sacrifice. Néanmoins, la perte des EmKCs renforce le développement de l'athérosclérose et valide ainsi notre hypothèse.

On pourrait supposer que les MoKCs seraient moins aptes à éliminer les lipoprotéines modifiées circulantes. Aussi, nous pourrions imaginer qu'il existe une interaction entre les KCs et les hépatocytes pour favoriser l'efflux de cholestérol qui soit altérée dans les EmKCs trop sollicitées ou bien que cette interaction et ce mécanisme ne soient pas ou peu actifs dans les MoKCs. Ces phénomènes favoriseraient *in fine* l'hypercholestérolémie et le développement de l'athérosclérose. Cette interaction proposée par Demetz met en jeu le transporteur ABCA1 au niveau des KCs (Demetz et al. 2020). Un RNAseq sur le foie total dans le modèle *CD207-DTR* est en cours et pourrait nous aider à répondre à ces questions.

Ainsi, nos données suggèrent fortement l'implication des KCs dans le métabolisme du cholestérol et le développement de l'athérosclérose. Si aujourd'hui, nous n'avons pas accès à des échantillons de foies issus de patients atteints d'hypercholestérolémie pour évaluer son impact sur la population de KCs, nous pourrions imaginer qu'elles puissent être une nouvelle cible thérapeutique. En effet, nous proposons de tester dans des modèles pré-cliniques l'injection de nanoparticules activées, aujourd'hui en plein développement, qui délivreraient dans les KCs, des neutralisants de ROS pour limiter leur souffrance cellulaire (Yuquan Wang et al. 2018) ou des agonistes de LXR (comme le desmostérol) afin de favoriser l'efflux de cholestérol (Y. Guo et al. 2018; M. Yu et al. 2017). Ceci dans l'objectif d'évaluer l'impact sur l'hypercholestérolémie et *in fine* sur le développement de l'athérosclérose.

VALORISATION DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Publications scientifiques

Rebecca Fima¹, Sébastien Dussaud ¹, Cheima Benbida¹, Margault Blanchet¹, Francois Lanthiez², Lucie Poupel^{1,3}, Claudia Brambilla, Martine Moreau¹, Philippe Lesnik¹, Alexandre Boissonnas², Emmanuel L. Gautier¹ and Thierry Huby^{1*}

“Loss of embryonically-derived Kupffer cells in the context of hypercholesterolemia accelerates atherosclerosis development”

En cours de soumission

Florent Arbogast^{1,2}, Raquel Sal-Carro¹, Wacym Boufenghour¹, Quentin Frenger^{2, 6}, Delphine Bouis¹, Louise Filippi De La Palavesa¹, Jean-Daniel Fauny¹, Olivier Griso³, Hélène Puccio³, **Rebecca Fima**⁷, Thierry Huby⁷, Emmanuel-Laurent Gautier⁷, Anne Molitor⁶, Raphaël Carapito⁶, Seiamak Bahram⁶, Nikolaus Romani⁴, Björn E. Clausen⁵, Benjamin Voisin¹, Christopher G. Mueller¹, Frédéric Gros^{1,2,6*}, Vincent Flacher^{1*}

“Epidermal maintenance of Langerhans cells relies on autophagy-regulated lipid metabolism “

En cours de soumission

Communications orales

Rebecca Fima¹, Sébastien Dussaud ¹, Lucie Poupel¹, Martine Moreau¹, Emmanuel L. Gautier¹ and Thierry Huby^{1*}

« Exploration de la fonction métabolique des cellules de Kupffer comme modulatrices de l’hypercholestérolémie »

Congrès 2021 de la SQLNM, du Réseau CMDO et du COLoSUS, 10-12 Février 2021, Quebec, Canada (en virtuel)

Rebecca Fima¹, Sébastien Dussaud ¹, Lucie Poupel¹, Martine Moreau¹, Emmanuel L. Gautier¹ and Thierry Huby^{1*}

“Exploring the metabolic function of Kupffer cells as modulators of hypercholesterolemia “

21th Doctoral School Days, 27-28 Mai 2021, Paris, France.

Communications affichées

Rebecca Fima, Martine Moreau, Tommaso Mancini, Emmanuel L. Gautier, Thierry Huby

“Hypercholesterolemia affects Kupffer cells homeostasis”
20th Doctoral School Days, 20-21 Mai 2019, Paris, France.

Rebecca Fima, Martine Moreau, Tommaso Mancini, Emmanuel L. Gautier, Thierry Huby

“Exploring the metabolic function of Kupffer cells as modulators of hypercholesterolemia”
Congrès de la Nouvelle Société Française d’Atherosclérose 2021.
23-24 juin 2021, Paris, France. (virtuel) **PRIX POSTER**

Rebecca Fima, Martine Moreau, Tommaso Mancini, Emmanuel L. Gautier, Thierry Huby

“Exploring the metabolic function of Kupffer cells as modulators of hypercholesterolemia”
Congrès de la Société Française d’Immunologie 2021, 7-9 Décembre 2021, Paris, France.

Margault Blanchet, **Rebecca Fima**, Sébastien Dussaud, Cheïma Benbida, Martine Moreau, Emmanuel L. Gautier, Gérard Helft, Thierry Huby

“Kupffer cells at the interface of cholesterol and iron homeostasis”
22th Doctoral School Days, 19-20 Mai 2022, Paris, France.

BIBLIOGRAPHIE

- Abul-Husn, Noura S. et al. 2016. « Genetic Identification of Familial Hypercholesterolemia within a Single U.S. Health Care System ». *Science (New York, N.Y.)* 354(6319): aaf7000.
- Acton, S. et al. 1996. « Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor ». *Science (New York, N.Y.)* 271(5248): 518-20.
- Aegerter, Helena et al. 2020. « Influenza-Induced Monocyte-Derived Alveolar Macrophages Confer Prolonged Antibacterial Protection ». *Nature Immunology* 21(2): 145-57.
- Ahmad, Feroz et al. 2021. « Cysteamine Decreases Low-Density Lipoprotein Oxidation, Causes Regression of Atherosclerosis, and Improves Liver and Muscle Function in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice ». *Journal of the American Heart Association* 10(18): e017524.
- Aichele, Peter et al. 2003. « Macrophages of the Splenic Marginal Zone Are Essential for Trapping of Blood-Borne Particulate Antigen but Dispensable for Induction of Specific T Cell Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171(3): 1148-55.
- Ait-Oufella, Hafid et al. 2006. « Natural Regulatory T Cells Control the Development of Atherosclerosis in Mice ». *Nature Medicine* 12(2): 178-80.
- Aizarani, Nadim et al. 2019. « A Human Liver Cell Atlas Reveals Heterogeneity and Epithelial Progenitors ». *Nature* 572(7768): 199-204.
- Ajami, Bahareh et al. 2011. « Infiltrating Monocytes Trigger EAE Progression, but Do Not Contribute to the Resident Microglia Pool ». *Nature Neuroscience* 14(9): 1142-49.
- Alencar, Gabriel F. et al. 2020. « Stem Cell Pluripotency Genes Klf4 and Oct4 Regulate Complex SMC Phenotypic Changes Critical in Late-Stage Atherosclerotic Lesion Pathogenesis ». *Circulation* 142(21): 2045-59.
- Almazroo, Omar Abdulhameed, Mohammad Kowser Miah, et Raman Venkataramanan. 2017. « Drug Metabolism in the Liver ». *Clinics in Liver Disease* 21(1): 1-20.
- Altmann, Scott W. et al. 2004. « Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption ». *Science (New York, N.Y.)* 303(5661): 1201-4.
- Angulo, Paul et al. 2015. « Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-Term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease ». *Gastroenterology* 149(2): 389-397.e10.
- Anseeuw, Ward, Liz Alden Wily, Lorenzo Cotula, et Taylor Michael. 2012. « Land Rights and the Rush for Land | The Consortium on Gender, Security and Human Rights ». <https://genderandsecurity.org/projects-resources/research/land-rights-and-rush-land> (1 août 2022).

- Antoniades, Charalambos Gustav et al. 2012. « Source and Characterization of Hepatic Macrophages in Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure in Humans ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 56(2): 735-46.
- Arnold, Ludovic et al. 2007. « Inflammatory Monocytes Recruited after Skeletal Muscle Injury Switch into Antiinflammatory Macrophages to Support Myogenesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 204(5): 1057-69.
- Auffray, Cedric et al. 2007. « Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior ». *Science (New York, N.Y.)* 317(5838): 666-70.
- Austin, Melissa A., Carolyn M. Hutter, Ron L. Zimmern, et Steve E. Humphries. 2004. « Genetic Causes of Monogenic Heterozygous Familial Hypercholesterolemia: A HuGE Prevalence Review ». *American Journal of Epidemiology* 160(5): 407-20.
- Avraham-Davidi, Inbal et al. 2013. « On-Site Education of VEGF-Recruited Monocytes Improves Their Performance as Angiogenic and Arteriogenic Accessory Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 210(12): 2611-25.
- Bäck, Magnus et al. 2019. « Inflammation and Its Resolution in Atherosclerosis: Mediators and Therapeutic Opportunities ». *Nature Reviews. Cardiology* 16(7): 389-406.
- Bain, Calum C., et Allan McI Mowat. 2014. « The Monocyte-Macrophage Axis in the Intestine ». *Cellular Immunology* 291(1-2): 41-48.
- Baker, Lauren et al. 2003. « The Role of Estrogen in Cardiovascular Disease ». *The Journal of Surgical Research* 115(2): 325-44.
- Barter, P J, G J Hopkins, et G D Calvert. 1982. « Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. » *Biochemical Journal* 208(1): 1-7.
- Basatemur, Gemma L. et al. 2019. « Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis ». *Nature Reviews. Cardiology* 16(12): 727-44.
- Beattie, Lynette et al. 2016. « Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions ». *Journal of Hepatology* 65(4): 758-68.
- Beheshti, Sabina O., Christian M. Madsen, Anette Varbo, et Børge G. Nordestgaard. 2020. « Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects ». *Journal of the American College of Cardiology* 75(20): 2553-66.
- Bell, Lauren N., et Naga Chalasani. 2009. « Epidemiology of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury ». *Seminars in Liver Disease* 29(04): 337-47.
- Benn, Marianne, Gerald F. Watts, Anne Tybjærg-Hansen, et Børge G. Nordestgaard. 2016. « Mutations Causative of Familial Hypercholesterolaemia: Screening of 98 098 Individuals from the Copenhagen General Population Study Estimated a Prevalence of 1 in 217 ». *European Heart Journal* 37(17): 1384-94.
- Benn, Marianne, Gerald Watts, Anne Tybjaerg-Hansen, et Børge Nordestgaard. 2012. « Familial Hypercholesterolemia in the Danish General Population: Prevalence,

- Coronary Artery Disease, and Cholesterol-Lowering Medication ». *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97.
- Bentzon, Jacob Fog, Fumiyuki Otsuka, Renu Virmani, et Erling Falk. 2014. « Mechanisms of Plaque Formation and Rupture ». *Circulation Research* 114(12): 1852-66.
- Bernal, William, et Julia Wendon. 2013. « Acute Liver Failure ». *New England Journal of Medicine* 369(26): 2525-34.
- Björkegren, Johan L. M., et Aldons J. Lusis. 2022. « Atherosclerosis: Recent Developments ». *Cell* 185(10): 1630-45.
- Bjørklund, Martin Mæng et al. 2014. « Induction of Atherosclerosis in Mice and Hamsters Without Germline Genetic Engineering ». *Circulation Research* 114(11): 1684-89.
- Blais, Joseph E. et al. 2021. « Trends in Lipid-Modifying Agent Use in 83 Countries ». *Atherosclerosis* 328: 44-51.
- Blériot, Camille et al. 2015. « Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection ». *Immunity* 42(1): 145-58.
- . 2021. « A Subset of Kupffer Cells Regulates Metabolism through the Expression of CD36 ». *Immunity* 54(9): 2101-2116.e6.
- Bobryshev, Y. V., et R. S. Lord. 1998. « Mapping of Vascular Dendritic Cells in Atherosclerotic Arteries Suggests Their Involvement in Local Immune-Inflammatory Reactions ». *Cardiovascular Research* 37(3): 799-810.
- Boer, Onno J. de et al. 2007. « Low Numbers of FOXP3 Positive Regulatory T Cells Are Present in All Developmental Stages of Human Atherosclerotic Lesions ». *PLOS ONE* 2(8): e779.
- Bonnardel, Johnny et al. 2019. « Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche ». *Immunity* 51(4): 638-654.e9.
- Bosschaerts, Tom et al. 2010. « Tip-DC Development during Parasitic Infection Is Regulated by IL-10 and Requires CCL2/CCR2, IFN-Gamma and MyD88 Signaling ». *PLoS pathogens* 6(8): e1001045.
- Bouchareychas, Laura et al. 2015. « Promoting Macrophage Survival Delays Progression of Pre-Existing Atherosclerotic Lesions through Macrophage-Derived ApoE ». *Cardiovascular Research* 108(1): 111-23.
- Bourdi, Mohammed et al. 2002. « Protection against Acetaminophen-Induced Liver Injury and Lethality by Interleukin 10: Role of Inducible Nitric Oxide Synthase ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35(2): 289-98.
- . 2007. « Role of IL-6 in an IL-10 and IL-4 Double Knockout Mouse Model Uniquely Susceptible to Acetaminophen-Induced Liver Injury ». *Chemical Research in Toxicology* 20(2): 208-16.

- Boyle, William J., W. Scott Simonet, et David L. Lacey. 2003. « Osteoclast Differentiation and Activation ». *Nature* 423(6937): 337-42.
- Broering, Ruth et al. 2008. « Toll-like Receptor-Stimulated Non-Parenchymal Liver Cells Can Regulate Hepatitis C Virus Replication ». *Journal of Hepatology* 48(6): 914-22.
- Bronte, Vincenzo et al. 2016. « Recommendations for Myeloid-Derived Suppressor Cell Nomenclature and Characterization Standards ». *Nature Communications* 7: 12150.
- Browicz. 1899. « Ueber intravasculäre Zellen in den Blutcapillaren der Leberacini ». *Archiv für mikroskopische Anatomie* 55(1): 420-26.
- Brown, M. S., et J. L. Goldstein. 1997. « The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor ». *Cell* 89(3): 331-40.
- Bucholz, Emily M. et al. 2018. « Prevalence and Predictors of Cholesterol Screening, Awareness, and Statin Treatment Among US Adults With Familial Hypercholesterolemia or Other Forms of Severe Dyslipidemia (1999-2014) ». *Circulation* 137(21): 2218-30.
- Carlin, Leo M. et al. 2013. « Nr4a1-Dependent Ly6C(Low) Monocytes Monitor Endothelial Cells and Orchestrate Their Disposal ». *Cell* 153(2): 362-75.
- Cassetta, Luca, et Jeffrey W. Pollard. 2018. « Targeting Macrophages: Therapeutic Approaches in Cancer ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 17(12): 887-904.
- Cecchini, M. G. et al. 1994. « Role of Colony Stimulating Factor-1 in the Establishment and Regulation of Tissue Macrophages during Postnatal Development of the Mouse ». *Development (Cambridge, England)* 120(6): 1357-72.
- Chang, Ta-Yuan, Bo-Liang Li, Catherine C. Y. Chang, et Yasuomi Urano. 2009. « Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases ». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 297(1): E1-9.
- Charo, Israel F., et Mark B. Taubman. 2004. « Chemokines in the Pathogenesis of Vascular Disease ». *Circulation Research* 95(9): 858-66.
- Chevreul, Eugène. 1815. « Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale ». *Annales de chimie*: 5-50.
- Chiang, J. Y., R. Kimmel, C. Weinberger, et D. Stroup. 2000. « Farnesoid X Receptor Responds to Bile Acids and Represses Cholesterol 7alpha-Hydroxylase Gene (CYP7A1) Transcription ». *The Journal of Biological Chemistry* 275(15): 10918-24.
- Choi, Dong-Young, Jung-Ok Ban, Sun-Chun Kim, et Jin Tae Hong. 2015. « CCR5 Knockout Mice with C57BL/6 Background Are Resistant to Acetaminophen-Mediated Hepatotoxicity Due to Decreased Macrophages Migration into the Liver ». *Archives of Toxicology* 89(2): 211-20.
- Chomarat, Pascale, Jacques Banchereau, Jean Davoust, et A. Palucka. 2001. « Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Palucka, A. K. IL-6 switches the differentiation of

- monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature Immunol.* 1, 510-514 ». *Nature immunology* 1: 510-14.
- Choquette, Leslie P. 1997. *Frenchmen into Peasants*. <https://www.hup.harvard.edu/catalog.php?isbn=9780674323155> (26 juillet 2022).
- Chou, Meng-Yun et al. 2009. « Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 119(5): 1335-49.
- Chung, Raymond T. et al. 2012. « Pathogenesis of Liver Injury in Acute Liver Failure ». *Gastroenterology* 143(3): e1-7.
- Cochain, Clément et al. 2018. « Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis ». *Circulation Research* 122(12): 1661-74.
- Coelho, Inês et al. 2020. « Trem-2 Promotes Emergence of Restorative Macrophages and Endothelial Cells During Recovery From Hepatic Tissue Damage ». *Frontiers in Immunology* 11: 616044.
- Cros, Jérôme et al. 2010. « Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors ». *Immunity* 33(3): 375-86.
- Cumano, A., F. Dieterlen-Lievre, et I. Godin. 1996. « Lymphoid Potential, Probed before Circulation in Mouse, Is Restricted to Caudal Intraembryonic Splanchnopleura ». *Cell* 86(6): 907-16.
- Cybulsky, M. I., et M. A. Gimbrone. 1991. « Endothelial Expression of a Mononuclear Leukocyte Adhesion Molecule during Atherogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 251(4995): 788-91.
- Dai, Xu-Ming et al. 2002. « Targeted Disruption of the Mouse Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Gene Results in Osteopetrosis, Mononuclear Phagocyte Deficiency, Increased Primitive Progenitor Cell Frequencies, and Reproductive Defects ». *Blood* 99(1): 111-20.
- Daugherty, Alan et al. 2017. « Recommendation on Design, Execution, and Reporting of Animal Atherosclerosis Studies: A Scientific Statement From the American Heart Association ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 37(9): e131-57.
- David, Bruna Araujo, Rafael Machado Rezende, Máisa Mota Antunes, Mônica Morais Santos, Maria Alice Freitas Lopes, Ariane Barros Diniz, Rafaela Vaz Sousa Pereira, Sarah Cozzer Marchesi, Débora Moreira Alvarenga, Brenda Naemi Nakagaki, Alan Moreira Araújo, Daniela Silva dos Reis, et al. 2016. « Combination of Mass Cytometry and Imaging Analysis Reveals Origin, Location, and Functional Repopulation of Liver Myeloid Cells in Mice ». *Gastroenterology* 151(6): 1176-91.
- Davies, Luke C., Stephen J. Jenkins, Judith E. Allen, et Philip R. Taylor. 2013. « Tissue-Resident Macrophages ». *Nature Immunology* 14(10): 986-95.

- Davignon, J., et M. Roy. 1993. « Familial Hypercholesterolemia in French-Canadians: Taking Advantage of the Presence of a “Founder Effect” ». *The American Journal of Cardiology* 72(10): 6D-10D.
- De Trez, Carl et al. 2009. « INOS-Producing Inflammatory Dendritic Cells Constitute the Major Infected Cell Type during the Chronic Leishmania Major Infection Phase of C57BL/6 Resistant Mice ». *PLoS pathogens* 5(6): e1000494.
- Delaby, Constance et al. 2005. « Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin ». *Blood* 106(12): 3979-84.
- DeLeve, Laurie D., Xiangdong Wang, et Yumei Guo. 2008. « Sinusoidal Endothelial Cells Prevent Rat Stellate Cell Activation and Promote Reversion to Quiescence ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48(3): 920-30.
- Demetz, Egon et al. 2020. « The Haemochromatosis Gene Hfe and Kupffer Cells Control LDL Cholesterol Homeostasis and Impact on Atherosclerosis Development ». *European Heart Journal* 41(40): 3949-59.
- Deppermann, Carsten et al. 2020. « Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets ». *The Journal of Experimental Medicine* 217(4): e20190723.
- Depuydt, Marie A. C. et al. 2020. « Microanatomy of the Human Atherosclerotic Plaque by Single-Cell Transcriptomics ». *Circulation Research* 127(11): 1437-55.
- Devisscher, Lindsey et al. 2017. « Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool ». *Cellular Immunology* 322: 74-83.
- Devries-Seimon, Tracie et al. 2005. « Cholesterol-Induced Macrophage Apoptosis Requires ER Stress Pathways and Engagement of the Type A Scavenger Receptor ». *The Journal of Cell Biology* 171(1): 61-73.
- Do, Ron et al. 2015. « Exome Sequencing Identifies Rare LDLR and APOA5 Alleles Conferring Risk for Myocardial Infarction ». *Nature* 518(7537): 102-6.
- Dong, Zhongjun, Haiming Wei, Rui Sun, et Zhigang Tian. 2007. « The Roles of Innate Immune Cells in Liver Injury and Regeneration ». *Molecular Immunology* 4(4): 12.
- Dou, Huijuan et al. 2021. « Oxidized Phospholipids Promote NETosis and Arterial Thrombosis in LNK(SH2B3) Deficiency ». *Circulation* 144(24): 1940-54.
- Drain, Colas et al. 2021. « Space-time logic of liver gene expression at sublobular scale ». *Nature metabolism* 3(1): 43-58.
- Dubland, Joshua A., et Gordon A. Francis. 2015. « Lysosomal Acid Lipase: At the Crossroads of Normal and Atherogenic Cholesterol Metabolism ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3: 3.
- Duffy, Danielle, et Daniel J. Rader. 2009. « Update on Strategies to Increase HDL Quantity and Function ». *Nature Reviews. Cardiology* 6(7): 455-63.

- Dunay, Ildiko R. et al. 2008. « Gr1(+) Inflammatory Monocytes Are Required for Mucosal Resistance to the Pathogen *Toxoplasma Gondii* ». *Immunity* 29(2): 306-17.
- Eckert, Christoph, Niklas Klein, Mirosław Kornek, et Veronika Lukacs-Kornek. 2015. « The Complex Myeloid Network of the Liver with Diverse Functional Capacity at Steady State and in Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 6: 179.
- Epelman, Slava et al. 2014. « Embryonic and Adult-Derived Resident Cardiac Macrophages Are Maintained through Distinct Mechanisms at Steady State and during Inflammation ». *Immunity* 40(1): 91-104.
- Epelman, Slava, Kory J. Lavine, et Gwendalyn J. Randolph. 2014. « Origin and Functions of Tissue Macrophages ». *Immunity* 41(1): 21-35.
- Erhardt, Annette, Markus Biburger, Thomas Papadopoulos, et Gisa Tiegs. 2007. « IL-10, Regulatory T Cells, and Kupffer Cells Mediate Tolerance in Concanavalin A-Induced Liver Injury in Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 45(2): 475-85.
- Estes, Chris et al. 2018. « Modeling NAFLD Disease Burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the Period 2016-2030 ». *Journal of Hepatology* 69(4): 896-904.
- Etzrodt, Martin et al. 2012. « Regulation of Monocyte Functional Heterogeneity by MiR-146a and Relb ». *Cell Reports* 1(4): 317-24.
- Evans, Trent D., Ismail Sergin, Xiangyu Zhang, et Babak Razani. 2017. « Target Acquired: Selective Autophagy in Cardiometabolic Disease ». *Science Signaling* 10(468): eaag2298.
- « FAO ». *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <http://www.fao.org/statistics/fr/> (9 août 2022).
- Fernandez-Ruiz, Daniel et al. 2016. « Liver-Resident Memory CD8+ T Cells Form a Front-Line Defense against Malaria Liver-Stage Infection ». *Immunity* 45(4): 889-902.
- Fife, B. T., G. B. Huffnagle, W. A. Kuziel, et W. J. Karpus. 2000. « CC Chemokine Receptor 2 Is Critical for Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *The Journal of Experimental Medicine* 192(6): 899-905.
- Firrcincieli, Delphine et al. 2011. « Role of Nuclear Receptors in the Biliary Epithelium ». *Digestive Diseases* 29(1): 52-57.
- Fisher, James E. et al. 2013. « Role of Kupffer Cells and Toll-like Receptor 4 in Acetaminophen-induced Acute Liver Failure ». *The Journal of surgical research* 180(1): 147-55.
- Fitzgerald, Kevin et al. 2017. « A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9 ». *New England Journal of Medicine* 376(1): 41-51.
- Fogg, Darin K. et al. 2006. « A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 311(5757): 83-87.

- Friedman, Scott L. 2008. « Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver ». *Physiological Reviews* 88(1): 125-72.
- Frostegård, J. et al. 1999. « Cytokine Expression in Advanced Human Atherosclerotic Plaques: Dominance of pro-Inflammatory (Th1) and Macrophage-Stimulating Cytokines ». *Atherosclerosis* 145(1): 33-43.
- van Furth, R. et al. 1972. « The Mononuclear Phagocyte System: A New Classification of Macrophages, Monocytes, and Their Precursor Cells ». *Bulletin of the World Health Organization* 46(6): 845-52.
- Galdiero, Maria Rosaria et al. 2013. « Tumor Associated Macrophages and Neutrophils in Cancer ». *Immunobiology* 218(11): 1402-10.
- Gammella, Elena, Paolo Buratti, Gaetano Cairo, et Stefania Recalcati. 2014. « Macrophages: Central Regulators of Iron Balance ». *Metallomics* 6(8): 1336-45.
- Gamrekelashvili, Jaba et al. 2016. « Regulation of Monocyte Cell Fate by Blood Vessels Mediated by Notch Signalling ». *Nature Communications* 7: 12597.
- Garcia, C. K. et al. 2001. « Autosomal Recessive Hypercholesterolemia Caused by Mutations in a Putative LDL Receptor Adaptor Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 292(5520): 1394-98.
- Gautier, Emmanuel L. et al. 2009. « Macrophage Apoptosis Exerts Divergent Effects on Atherogenesis as a Function of Lesion Stage ». *Circulation* 119(13): 1795-1804.
- Gautier, Emmanuel L et al. 2012. « Gene-Expression Profiles and Transcriptional Regulatory Pathways That Underlie the Identity and Diversity of Mouse Tissue Macrophages ». *Nature Immunology* 13(11): 1118-28.
- Gautier, Emmanuel L., Stoyan Ivanov, Philippe Lesnik, et Gwendalyn J. Randolph. 2013. « Local Apoptosis Mediates Clearance of Macrophages from Resolving Inflammation in Mice ». *Blood* 122(15): 2714-22.
- Geissmann, Frederic et al. 2005. « Intravascular Immune Surveillance by CXCR6+ NKT Cells Patrolling Liver Sinusoids ». *PLOS Biology* 3(4): e113.
- Geng, Y. J., et P. Libby. 1995. « Evidence for Apoptosis in Advanced Human Atheroma. Colocalization with Interleukin-1 Beta-Converting Enzyme ». *The American Journal of Pathology* 147(2): 251-66.
- Gerlach, Brennan D. et al. 2021. « Efferocytosis Induces Macrophage Proliferation to Help Resolve Tissue Injury ». *Cell Metabolism* 33(12): 2445-2463.e8.
- Gibbins, Sophie L. et al. 2015. « Transcriptome Analysis Highlights the Conserved Difference between Embryonic and Postnatal-Derived Alveolar Macrophages ». *Blood* 126(11): 1357-66.
- Gidding, Samuel S. et al. 2015. « The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement From the American Heart Association ». *Circulation* 132(22): 2167-92.

- Gilboa, Dafna et al. 2017. « Erythropoietin enhances Kupffer cell number and activity in the challenged liver ». *Scientific Reports* 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583293/> (17 septembre 2019).
- Ginhoux, Florent, et Steffen Jung. 2014. « Monocytes and Macrophages: Developmental Pathways and Tissue Homeostasis ». *Nature Reviews Immunology* 14(6): 392-404.
- Gisterå, Anton et al. 2013. « Transforming Growth Factor- β Signaling in T Cells Promotes Stabilization of Atherosclerotic Plaques through an Interleukin-17-Dependent Pathway ». *Science Translational Medicine* 5(196): 196ra100.
- Gisterå, Anton, et Göran K. Hansson. 2017. « The Immunology of Atherosclerosis ». *Nature Reviews Nephrology* 13(6): 368-80.
- Goettsch, Claudia et al. 2016. « A Single Injection of Gain-of-Function Mutant PCSK9 Adeno-Associated Virus Vector Induces Cardiovascular Calcification in Mice with No Genetic Modification ». *Atherosclerosis* 251: 109-18.
- Gola, Anita et al. 2021. « Commensal-Driven Immune Zonation of the Liver Promotes Host Defence ». *Nature* 589(7840): 131-36.
- Gomez Perdiguero, Elisa et al. 2015. « Tissue-Resident Macrophages Originate from Yolk-Sac-Derived Erythro-Myeloid Progenitors ». *Nature* 518(7540): 547-51.
- Gordon, Siamon, et Philip R. Taylor. 2005. « Monocyte and Macrophage Heterogeneity ». *Nature Reviews. Immunology* 5(12): 953-64.
- Guilliams, Martin et al. 2009. « IL-10 Dampens TNF/Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cell-Mediated Pathogenicity during Parasitic Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182(2): 1107-18.
- . 2016. « Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species ». *Immunity* 45(3): 669-84.
- . 2022. « Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches ». *Cell* 185(2): 379-396.e38.
- Guilliams, Martin, Alexander Mildner, et Simon Yona. 2018. « Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes ». *Immunity* 49(4): 595-613.
- Guilliams, Martin, et Charlotte L. Scott. 2017. « Does Niche Competition Determine the Origin of Tissue-Resident Macrophages? ». *Nature Reviews. Immunology* 17(7): 451-60.
- Guo, Haitao, Justin B. Callaway, et Jenny P.-Y. Ting. 2015. « Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics ». *Nature Medicine* 21(7): 677-87.
- Guo, Yanhong et al. 2018. « Synthetic High-Density Lipoprotein-Mediated Targeted Delivery of Liver X Receptors Agonist Promotes Atherosclerosis Regression ». *EBioMedicine* 28: 225-33.
- Gupta, S. et al. 1997. « IFN-Gamma Potentiates Atherosclerosis in ApoE Knock-out Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 99(11): 2752-61.

- Haldar, Malay, et Kenneth M. Murphy. 2014. « Origin, Development, and Homeostasis of Tissue-Resident Macrophages ». *Immunological Reviews* 262(1): 25-35.
- Hashimoto, Daigo et al. 2013. « Tissue-Resident Macrophages Self-Maintain Locally throughout Adult Life with Minimal Contribution from Circulating Monocytes ». *Immunity* 38(4): 792-804.
- Hentze, Matthias W., Martina U. Muckenthaler, Bruno Galy, et Clara Camaschella. 2010. « Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism ». *Cell* 142(1): 24-38.
- Hettinger, Jan et al. 2013. « Origin of Monocytes and Macrophages in a Committed Progenitor ». *Nature Immunology* 14(8): 821-30.
- Heyde, Alexander et al. 2021. « Increased Stem Cell Proliferation in Atherosclerosis Accelerates Clonal Hematopoiesis ». *Cell* 184(5): 1348-1361.e22.
- Heymann, Felix et al. 2015. « Liver Inflammation Abrogates Immunological Tolerance Induced by Kupffer Cells ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 62(1): 279-91.
- Heymann, Felix, et Frank Tacke. 2016. « Immunology in the Liver--from Homeostasis to Disease ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 13(2): 88-110.
- Hobbs, H. H. et al. 1987. « Deletion in the Gene for the Low-Density-Lipoprotein Receptor in a Majority of French Canadians with Familial Hypercholesterolemia ». *The New England Journal of Medicine* 317(12): 734-37.
- Hoeffel, Guillaume et al. 2015. « C-Myb(+) Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages ». *Immunity* 42(4): 665-78.
- Holt, Michael P., LinLing Cheng, et Cynthia Ju. 2008. « Identification and Characterization of Infiltrating Macrophages in Acetaminophen-Induced Liver Injury ». *Journal of Leukocyte Biology* 84(6): 1410-21.
- Horton, Jay D., Joseph L. Goldstein, et Michael S. Brown. 2002. « SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver ». *The Journal of Clinical Investigation* 109(9): 1125-31.
- Huby, Thierry, et Emmanuel L. Gautier. 2021. « Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis ». *Nature Reviews. Immunology*: 1-15.
- Hume, David A., Stefan Offermanns, et Remy Bonnavion. 2022. « Contamination of Isolated Mouse Kupffer Cells with Liver Sinusoidal Endothelial Cells ». *Immunity* 55(7): 1139-40.
- Hussell, Tracy, et Thomas J. Bell. 2014. « Alveolar Macrophages: Plasticity in a Tissue-Specific Context ». *Nature Reviews. Immunology* 14(2): 81-93.
- Huynh, Jeremy P. et al. 2018. « Bhlhe40 Is an Essential Repressor of IL-10 during Mycobacterium Tuberculosis Infection ». *The Journal of Experimental Medicine* 215(7): 1823-38.

- Ibrahim, Michael A., Edinen Asuka, et Ishwarlal Jialal. 2021. StatPearls [Internet] *Hypercholesterolemia*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459188/> (25 juillet 2022).
- Infante, Rodney E. et al. 2008. « NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(40): 15287-92.
- Ingersoll, Molly A. et al. 2010. « Comparison of Gene Expression Profiles between Human and Mouse Monocyte Subsets ». *Blood* 115(3): e10-19.
- Ishibashi, S. et al. 1993. « Hypercholesterolemia in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice and Its Reversal by Adenovirus-Mediated Gene Delivery ». *The Journal of Clinical Investigation* 92(2): 883-93.
- Izikson, Leonid, Robyn S. Klein, Andrew D. Luster, et Howard L. Weiner. 2002. « Targeting Monocyte Recruitment in CNS Autoimmune Disease ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 103(2): 125-31.
- Jaitin, Diego Adhemar et al. 2019. « Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner ». *Cell* 178(3): 686-698.e14.
- Jakubzick, Claudia V., Gwendalyn J. Randolph, et Peter M. Henson. 2017. « Monocyte Differentiation and Antigen-Presenting Functions ». *Nature Reviews Immunology* 17(6): 349-62.
- Jakulj, Lily et al. 2016. « Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion ». *Cell Metabolism* 24(6): 783-94.
- Jarjour, Nicholas N. et al. 2019. « Bhlhe40 Mediates Tissue-Specific Control of Macrophage Proliferation in Homeostasis and Type 2 Immunity ». *Nature Immunology* 20(6): 687-700.
- Jeney, Viktória, György Balla, et József Balla. 2014. « Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis ». *Frontiers in Physiology* 5: 379.
- Jenne, Craig N., et Paul Kubes. 2013. « Immune Surveillance by the Liver ». *Nature Immunology* 14(10): 996-1006.
- Jiang, Yizhi et al. 2021. « Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice ». *Cell Death and Differentiation* 28(11): 3009-21.
- Jin, Hengwei et al. 2021. « Genetic fate-mapping reveals surface accumulation but not deep organ invasion of pleural and peritoneal cavity macrophages following injury ». *Nature Communications* 12: 2863.
- Jonasson, L. et al. 1986. « Regional Accumulations of T Cells, Macrophages, and Smooth Muscle Cells in the Human Atherosclerotic Plaque ». *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 6(2): 131-38.

- Kalra, Arjun, Ekrem Yetiskul, Chase J. Wehrle, et Faiz Tuma. 2022. StatPearls [Internet] *Physiology, Liver*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535438/> (30 juin 2022).
- Kanneganti, Thirumala-Devi, Mohamed Lamkanfi, et Gabriel Núñez. 2007. « Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease ». *Immunity* 27(4): 549-59.
- Kennedy, Matthew A. et al. 2005. « ABCG1 Has a Critical Role in Mediating Cholesterol Efflux to HDL and Preventing Cellular Lipid Accumulation ». *Cell Metabolism* 1(2): 121-31.
- King, Irah L., Travis L. Dickendeshner, et Benjamin M. Segal. 2009. « Circulating Ly-6C+ Myeloid Precursors Migrate to the CNS and Play a Pathogenic Role during Autoimmune Demyelinating Disease ». *Blood* 113(14): 3190-97.
- Knolle, P. et al. 1995. « Human Kupffer Cells Secrete IL-10 in Response to Lipopolysaccharide (LPS) Challenge ». *Journal of Hepatology* 22(2): 226-29.
- Kohyama, Masako et al. 2009. « Role for Spi-C in the Development of Red Pulp Macrophages and Splenic Iron Homeostasis ». *Nature* 457(7227): 318-21.
- Krenkel, Oliver, et Frank Tacke. 2017. « Liver Macrophages in Tissue Homeostasis and Disease ». *Nature Reviews Immunology* 17(5): 306-21.
- Kristiansen, Mette et al. 2001. « Identification of the Haemoglobin Scavenger Receptor ». *Nature* 409(6817): 198-201.
- Kubit, Ralf et al. 2012. « The Bile Salt Export Pump (BSEP) in Health and Disease ». *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 36(6): 536-53.
- Kupffer, C. 1876. « Ueber Sternzellen der Leber ». *Archiv für mikroskopische Anatomie* 12(1): 353-58.
- Kwon, Hyock Joo et al. 2009. « Structure of N-Terminal Domain of NPC1 Reveals Distinct Subdomains for Binding and Transfer of Cholesterol ». *Cell* 137(7): 1213-24.
- van de Laar, Lianne et al. 2016. « Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages ». *Immunity* 44(4): 755-68.
- Lagace, Thomas A. 2014. « PCSK9 and LDLR Degradation: Regulatory Mechanisms in Circulation and in Cells ». *Current Opinion in Lipidology* 25(5): 387-93.
- Lai, Si Min et al. 2018. « Organ-Specific Fate, Recruitment, and Refilling Dynamics of Tissue-Resident Macrophages during Blood-Stage Malaria ». *Cell Reports* 25(11): 3099-3109.e3.
- Landry, Yves. 1993. « Les filles du roi au XVIIe siècle : orphelines en France, pionnières au Canada, 1992 ». *Annales de Démographie Historique* 1993(1): 433-37.
- Lavin, Yonit et al. 2014. « Tissue-Resident Macrophage Enhancer Landscapes Are Shaped by the Local Microenvironment ». *Cell* 159(6): 1312-26.

- Le May, Cédric et al. 2013. « Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33(7): 1484-93.
- Lee, Jaemin, et Umut Ozcan. 2014. « Unfolded Protein Response Signaling and Metabolic Diseases ». *The Journal of Biological Chemistry* 289(3): 1203-11.
- Levine, Beth, et Guido Kroemer. 2008. « Autophagy in the Pathogenesis of Disease ». *Cell* 132(1): 27-42.
- Li, Yan et al. 2014. « Inflammatory Signaling Regulates Embryonic Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Production ». *Genes & Development* 28(23): 2597-2612.
- Libby, Peter. 2013. « Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy ». *The New England Journal of Medicine* 368(21): 2004-13.
- . 2021. « The Changing Landscape of Atherosclerosis ». *Nature* 592(7855): 524-33.
- Liu, Zhaoyuan et al. 2019. « Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells ». *Cell* 178(6): 1509-1525.e19.
- Lopez, Bryan G et al. 2011. « Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice ». *Comparative Hepatology* 10: 2.
- Luo, Jie, Lu-Yi Jiang, Hongyuan Yang, et Bao-Liang Song. 2019. « Intracellular Cholesterol Transport by Sterol Transfer Proteins at Membrane Contact Sites ». *Trends in Biochemical Sciences* 44(3): 273-92.
- Luo, Jie, Hongyuan Yang, et Bao-Liang Song. 2020. « Mechanisms and Regulation of Cholesterol Homeostasis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(4): 225-45.
- Luo, Pingping et al. 2019. « Divergent Roles of Kupffer Cell TLR2/3 Signaling in Alcoholic Liver Disease and the Protective Role of EGCG ». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 9(1): 145-60.
- Luo, Zhenlong et al. 2021. « CR1g+ macrophages prevent gut microbial DNA-containing extracellular vesicle-induced tissue inflammation and insulin resistance ». *Gastroenterology* 160(3): 863-74.
- Machado, Mariana Verdelho et al. 2015. « Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease ». *PloS One* 10(5): e0127991.
- Machiels, Bénédicte et al. 2017. « A Gammaherpesvirus Provides Protection against Allergic Asthma by Inducing the Replacement of Resident Alveolar Macrophages with Regulatory Monocytes ». *Nature Immunology* 18(12): 1310-20.
- MacParland, Sonya A. et al. 2018. « Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations ». *Nature Communications* 9: 4383.
- Mallat, Ziad et al. 1999. « Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis ». *Circulation Research* 85(8): e17-24.

- Marcus, B. C., C. W. Wyble, K. L. Hynes, et B. L. Gewertz. 1996. « Cytokine-Induced Increases in Endothelial Permeability Occur after Adhesion Molecule Expression ». *Surgery* 120(2): 411-16; discussion 416-417.
- Marzioni, Marco et al. 2002. « Functional Heterogeneity of Cholangiocytes ». *Seminars in Liver Disease* 22(3): 227-40.
- Mass, Elvira et al. 2016. « Specification of Tissue-Resident Macrophages during Organogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 353(6304): aaf4238.
- Maxwell, Kara N., et Jan L. Breslow. 2004. « Adenoviral-Mediated Expression of Pcsk9 in Mice Results in a Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Phenotype ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(18): 7100-7105.
- Mazoyer, Marcel, et Laurence Roudart. « AGRICULTURE - Histoire des agricultures depuis le XXe siècle ». <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/agriculture-histoire-des-agricultures-depuis-le-xxe-siecle/> (1 août 2022).
- Mildner, Alexander et al. 2013. « Mononuclear Phagocyte MiRNome Analysis Identifies MiR-142 as Critical Regulator of Murine Dendritic Cell Homeostasis ». *Blood* 121(6): 1016-27.
- Molawi, Kaaweh et al. 2014. « Progressive Replacement of Embryo-Derived Cardiac Macrophages with Age ». *The Journal of Experimental Medicine* 211(11): 2151-58.
- Montanari, Massimo, et Jean-Louis Flandrin. 1996. *Histoire de l'alimentation*. Fayard. <https://livre.fnac.com/a995515/Jean-Louis-Flandrin-Histoire-de-l-alimentation>.
- Moore, Kathryn J., et Ira Tabas. 2011. « Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis ». *Cell* 145(3): 341-55.
- Morgan, Pooranee K., Longhou Fang, Graeme I. Lancaster, et Andrew J. Murphy. 2020. « Hematopoiesis Is Regulated by Cholesterol Efflux Pathways and Lipid Rafts: Connections with Cardiovascular Diseases: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts ». *Journal of Lipid Research* 61(5): 667-75.
- Mori, Hiroyoshi et al. 2018. « Coronary Artery Calcification and Its Progression: What Does It Really Mean? » *JACC. Cardiovascular imaging* 11(1): 127-42.
- Moro-Sibilot, Ludovic et al. 2016. « Mouse and Human Liver Contain Immunoglobulin A-Secreting Cells Originating From Peyer's Patches and Directed Against Intestinal Antigens ». *Gastroenterology* 151(2): 311-23.
- Mossanen, Jana C. et al. 2016. « Chemokine (C-C Motif) Receptor 2-Positive Monocytes Aggravate the Early Phase of Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury ». *Hepatology* 64(5): 1667-82.
- Movita, Dowty et al. 2015. « Inflammatory Monocytes Recruited to the Liver within 24 Hours after Virus-Induced Inflammation Resemble Kupffer Cells but Are Functionally Distinct ». *Journal of Virology* 89(9): 4809-17.

- Mukherjee, Pallavi et al. 2021. « Oxidized phospholipids cause changes in jejunum mucus that induce dysbiosis and systemic inflammation ». *Journal of Lipid Research* 63(1): 100153.
- Muller, Paul Andrew et al. 2014. « Crosstalk between Muscularis Macrophages and Enteric Neurons Regulates Gastrointestinal Motility ». *Cell* 158(2): 300-313.
- Murray, Peter J., et Thomas A. Wynn. 2011. « Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets ». *Nature Reviews. Immunology* 11(11): 723-37.
- Musunuru, Kiran et al. 2021. « In Vivo CRISPR Base Editing of PCSK9 Durably Lowers Cholesterol in Primates ». *Nature* 593(7859): 429-34.
- Nahrendorf, Matthias et al. 2007. « The Healing Myocardium Sequentially Mobilizes Two Monocyte Subsets with Divergent and Complementary Functions ». *The Journal of Experimental Medicine* 204(12): 3037-47.
- Nakamoto, Nobuhiro, et Takanori Kanai. 2014. « Role of Toll-Like Receptors in Immune Activation and Tolerance in the Liver ». *Frontiers in Immunology* 5: 221.
- Newman, Alexandra A. C. et al. 2021. « Multiple Cell Types Contribute to the Atherosclerotic Lesion Fibrous Cap by PDGFR β and Bioenergetic Mechanisms ». *Nature Metabolism* 3(2): 166-81.
- Newson, Justine et al. 2014. « Resolution of Acute Inflammation Bridges the Gap between Innate and Adaptive Immunity ». *Blood* 124(11): 1748-64.
- Noonan, Jonathan, Alex Bobik, et Karlheinz Peter. 2022. « The Tandem Stenosis Mouse Model: Towards Understanding, Imaging, and Preventing Atherosclerotic Plaque Instability and Rupture ». *British Journal of Pharmacology* 179(5): 979-97.
- Noy, Roy, et Jeffrey W. Pollard. 2014. « Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy ». *Immunity* 41(1): 49-61.
- O'Brien, Luke et al. 2015. « Biliverdin Reductase Isozymes in Metabolism ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 26(4): 212-20.
- Ohtani, K. et al. 2001. « The Membrane-Type Collectin CL-P1 Is a Scavenger Receptor on Vascular Endothelial Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(47): 44222-28.
- Oishi, Yumiko, et Ichiro Manabe. 2018. « Macrophages in Inflammation, Repair and Regeneration ». *International Immunology* 30(11): 511-28.
- OMS. 1957. « Rapport du groupe d'étude de la classification des lésions d'athérosclérose ». : 30.
- . « Cardiovascular diseases (CVDs) ». [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) (2 août 2022a).
- . *Indicator Metadata Registry Details*. <https://www.who.int/data/gho/indicator-metadata-registry/imr-details/3236> (26 juillet 2022b).

- Orecchioni, Marco et al. 2022. « Olfactory receptor 2 in vascular macrophages drives atherosclerosis by NLRP3-dependent IL-1 production ». *Science* 375(6577): 214-21.
- Ortega-Gómez, Almudena, Mauro Perretti, et Oliver Soehnlein. 2013. « Resolution of Inflammation: An Integrated View ». *EMBO molecular medicine* 5(5): 661-74.
- Ouimet, Mireille et al. 2011. « Autophagy Regulates Cholesterol Efflux from Macrophage Foam Cells via Lysosomal Acid Lipase ». *Cell Metabolism* 13(6): 655-67.
- Pan, Huize et al. 2020. « Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human ». *Circulation* 142(21): 2060-75.
- Paquette, Martine, Robert Dufour, et Alexis Baass. 2017. « The Montreal-FH-SCORE: A New Score to Predict Cardiovascular Events in Familial Hypercholesterolemia ». *Journal of Clinical Lipidology* 11(1): 80-86.
- Parkhurst, Christopher N. et al. 2013. « Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor ». *Cell* 155(7): 1596-1609.
- Passlick, B., D. Flieger, et H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. « Identification and Characterization of a Novel Monocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood ». *Blood* 74(7): 2527-34.
- Pasterkamp, Gerard, Hester M. den Ruijter, et Peter Libby. 2017. « Temporal Shifts in Clinical Presentation and Underlying Mechanisms of Atherosclerotic Disease ». *Nature Reviews. Cardiology* 14(1): 21-29.
- Patel, Amit A. et al. 2017. « The Fate and Lifespan of Human Monocyte Subsets in Steady State and Systemic Inflammation ». *The Journal of Experimental Medicine* 214(7): 1913-23.
- Platt, Andrew M. et al. 2010. « An Independent Subset of TLR Expressing CCR2-Dependent Macrophages Promotes Colonic Inflammation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184(12): 6843-54.
- Porter, J. A., K. E. Young, et P. A. Beachy. 1996. « Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development ». *Science (New York, N.Y.)* 274(5285): 255-59.
- Pose, Elisa et al. 2021. « Programmed Death Ligand 1 Is Overexpressed in Liver Macrophages in Chronic Liver Diseases, and Its Blockade Improves the Antibacterial Activity Against Infections ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 74(1): 296-311.
- Que, Xuchu et al. 2018. « Oxidized Phospholipids Are Proinflammatory and Proatherogenic in Hypercholesterolaemic Mice ». *Nature* 558(7709): 301-6.
- Quillard, Thibaut et al. 2017. « Mechanisms of Erosion of Atherosclerotic Plaques ». *Current Opinion in Lipidology* 28(5): 434-41.
- Raal, Frederick J et al. 2015. « Inhibition of PCSK9 with Evolocumab in Homozygous Familial Hypercholesterolaemia (TESLA Part B): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *The Lancet* 385(9965): 341-50.

- Rader, Daniel J., Jonathan Cohen, et Helen H. Hobbs. 2003. « Monogenic Hypercholesterolemia: New Insights in Pathogenesis and Treatment ». *The Journal of Clinical Investigation* 111(12): 1795-1803.
- Rahaman, S.O. et al. 2006. « A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation ». *Cell metabolism* 4(3): 211-21.
- Ramachandran, P et al. 2019. « Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single cell level ». *Nature* 575(7783): 512-18.
- Ramachandran, Prakash et al. 2012. « Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(46): E3186-95.
- Ramírez-Pérez, Oscar, Vania Cruz-Ramón, Paulina Chinchilla-López, et Nahum Méndez-Sánchez. 2017. « The Role of the Gut Microbiota in Bile Acid Metabolism ». *Annals of Hepatology* 16: S21-26.
- Rauschmeier, René et al. 2019. « Bhlhe40 and Bhlhe41 Transcription Factors Regulate Alveolar Macrophage Self-Renewal and Identity ». *The EMBO journal* 38(19): e101233.
- Ravichandran, Kodi S. 2011. « Beginnings of a Good Apoptotic Meal: The Find-Me and Eat-Me Signaling Pathways ». *Immunity* 35(4): 445-55.
- Remmerie, Anneleen et al. 2020. « Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver ». *Immunity* 53(3): 641-657.e14.
- Remmerie, Anneleen, et Charlotte L. Scott. 2018. « Macrophages and lipid metabolism ». *Cellular Immunology* 330: 27-42.
- Repa, J. J., et D. J. Mangelsdorf. 2000. « The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 459-81.
- Robbins, Clinton S. et al. 2013. « Local Proliferation Dominates Lesional Macrophage Accumulation in Atherosclerosis ». *Nature Medicine* 19(9): 1166-72.
- Roohani, Siyer, et Frank Tacke. 2021. « Liver Injury and the Macrophage Issue: Molecular and Mechanistic Facts and Their Clinical Relevance ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(14): 7249.
- Rosales, Carlos. 2020. « Neutrophils at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity ». *Journal of Leukocyte Biology* 108(1): 377-96.
- Rossaint, Jan, et Alexander Zarbock. 2013. « Tissue-Specific Neutrophil Recruitment into the Lung, Liver, and Kidney ». *Journal of Innate Immunity* 5(4): 348-57.
- Rudenko, Gabby et al. 2002. « Structure of the LDL Receptor Extracellular Domain at Endosomal PH ». *Science (New York, N.Y.)* 298(5602): 2353-58.

- Ruffell, Brian, et Lisa M. Coussens. 2015. « Macrophages and Therapeutic Resistance in Cancer ». *Cancer Cell* 27(4): 462-72.
- Sage, Andrew P., Dimitrios Tsiantoulas, Christoph J. Binder, et Ziad Mallat. 2019. « The Role of B Cells in Atherosclerosis ». *Nature Reviews. Cardiology* 16(3): 180-96.
- Sakai, Mashito et al. 2019. « Liver-derived signals sequentially reprogram myeloid enhancers to initiate and maintain Kupffer cell identity ». *Immunity* 51(4): 655-670.e8.
- Sanda, Gabriela M. et al. 2021. « Aggregated LDL Turn Human Macrophages into Foam Cells and Induce Mitochondrial Dysfunction without Triggering Oxidative or Endoplasmic Reticulum Stress » éd. Yi Cao. *PLOS ONE* 16(1): e0245797.
- Sawai, Catherine M. et al. 2016. « Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals ». *Immunity* 45(3): 597-609.
- Saxena, R., N. D. Theise, et J. M. Crawford. 1999. « Microanatomy of the Human Liver- Exploring the Hidden Interfaces ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 30(6): 1339-46.
- Schafer, Dorothy P. et al. 2012. « Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner ». *Neuron* 74(4): 691-705.
- von Scheidt, Moritz et al. 2017. « Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis ». *Cell Metabolism* 25(2): 248-61.
- Schloss, Maximilian J., Filip K. Swirski, et Matthias Nahrendorf. 2020. « Modifiable Cardiovascular Risk, Hematopoiesis, and Innate Immunity ». *Circulation Research* 126(9): 1242-59.
- Schulz, Christian et al. 2012. « A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 336(6077): 86-90.
- Scott, Charlotte L. et al. 2016. « Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells ». *Nature Communications* 7: 10321.
- . 2018. « The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages ». *Immunity* 49(2): 312-325.e5.
- Scott, Charlotte L, et Martin Guilliams. 2018. « Hepatology Snapshot: The role of Kupffer cells in hepatic iron and lipid metabolism ». *Journal of hepatology* 69(5): 1197-99.
- Scull, Christopher M., et Ira Tabas. 2011. « Mechanisms of ER Stress-induced Apoptosis in Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31(12): 2792-97.
- Seidman, Jason S. et al. 2020. « Niche-Specific Re-Programming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Immunity* 52(6): 1057-1074.e7.
- Serbina, Natalya V. et al. 2003. « TNF/INOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection ». *Immunity* 19(1): 59-70.

- Shaw, Tovah N. et al. 2018. « Tissue-Resident Macrophages in the Intestine Are Long Lived and Defined by Tim-4 and CD4 Expression ». *The Journal of Experimental Medicine* 215(6): 1507-18.
- Shearn, Andrew I. U. et al. 2012. « Bcl-x Inactivation in Macrophages Accelerates Progression of Advanced Atherosclerotic Lesions in Apoe(-/-) Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32(5): 1142-49.
- Shemer, Anat, Daniel Erny, Steffen Jung, et Marco Prinz. 2015. « Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective ». *Trends in Immunology* 36(10): 614-24.
- Sheng, Jianpeng, Christiane Ruedl, et Klaus Karjalainen. 2015. « Fetal HSCs versus EMP2s ». *Immunity* 43(6): 1025.
- Shibuya, Yohei, Catherine Cy Chang, et Ta-Yuan Chang. 2015. « ACAT1/SOAT1 as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease ». *Future Medicinal Chemistry* 7(18): 2451-67.
- Sierro, Frederic et al. 2017. « A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment ». *Immunity* 47(2): 374-388.e6.
- Silvente-Poirot, Sandrine, et Marc Poirot. 2014. « Cancer. Cholesterol and Cancer, in the Balance ». *Science (New York, N.Y.)* 343(6178): 1445-46.
- Simon, Tabassome et al. 2013. « Circulating Levels of Interleukin-17 and Cardiovascular Outcomes in Patients with Acute Myocardial Infarction ». *European Heart Journal* 34(8): 570-77.
- Si-Tayeb, Karim, Frédéric P. Lemaigre, et Stephen A. Duncan. 2010. « Organogenesis and Development of the Liver ». *Developmental Cell* 18(2): 175-89.
- Skaria, Tom, Julia Burgener, Esther Bachli, et Gabriele Schoedon. 2016. « IL-4 Causes Hyperpermeability of Vascular Endothelial Cells through Wnt5A Signaling ». *PloS One* 11(5): e0156002.
- Softic, Samir, David E. Cohen, et C. Ronald Kahn. 2016. « Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease ». *Digestive Diseases and Sciences* 61(5): 1282-93.
- Souilhol, Celine et al. 2020. « Endothelial Responses to Shear Stress in Atherosclerosis: A Novel Role for Developmental Genes ». *Nature Reviews Cardiology* 17(1): 52-63.
- Speer, Mei Y. et al. 2009. « Smooth Muscle Cells Give Rise to Osteochondrogenic Precursors and Chondrocytes in Calcifying Arteries ». *Circulation Research* 104(6): 733-41.
- Sтары, H. C. et al. 1995. « A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association ». *Circulation* 92(5): 1355-74.

- Steensma, David P., et Robert A. Kyle. 2021. « James Till and Ernest McCulloch: Hematopoietic Stem Cell Discoverers ». *Mayo Clinic Proceedings* 96(3): 830-31.
- Steinberg, Daniel, et Joseph L. Witztum. 2010. « Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30(12): 2311-16.
- Steinert, Elizabeth M. et al. 2015. « Quantifying Memory CD8 T Cells Reveals Regionalization of Immunosurveillance ». *Cell* 161(4): 737-49.
- Strazzabosco, M., C. Spirlí, et L. Okolicsanyi. 2000. « Pathophysiology of the Intrahepatic Biliary Epithelium ». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15(3): 244-53.
- Sturm, Amy C. et al. 2018. « Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel ». *Journal of the American College of Cardiology* 72(6): 662-80.
- Suzuki, Hiroshi et al. 1997. « A Role for Macrophage Scavenger Receptors in Atherosclerosis and Susceptibility to Infection ». *Nature* 386(6622): 292-96.
- Swirski, Filip K. et al. 2009. « Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites ». *Science (New York, N.Y.)* 325(5940): 612-16.
- Tabas, Ira et al. 2009. « Macrophage Apoptosis in Advanced Atherosclerosis ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1173 Suppl 1: E40-45.
- Tacke, Frank et al. 2007. « Monocyte Subsets Differentially Employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to Accumulate within Atherosclerotic Plaques ». *The Journal of Clinical Investigation* 117(1): 185-94.
- Takeuchi, Osamu, et Shizuo Akira. 2010. « Pattern Recognition Receptors and Inflammation ». *Cell* 140(6): 805-20.
- Terpstra, Valeska, et Theo J. C. van Berkel. 2000. « Scavenger Receptors on Liver Kupffer Cells Mediate the in Vivo Uptake of Oxidatively Damaged Red Blood Cells in Mice ». *Blood* 95(6): 2157-63.
- Terry, Rachael L., et Stephen D. Miller. 2014. « Molecular Control of Monocyte Development ». *Cellular Immunology* 291(1-2): 16-21.
- Themes, U. F. O. 2019. « Lipids, Lipoproteins and Cardiovascular Disease ». *Basicmedical Key*. <https://basicmedicalkey.com/lipids-lipoproteins-and-cardiovascular-disease/> (12 juillet 2022).
- Theurl, Igor et al. 2016. « On-Demand Erythrocyte Disposal and Iron Recycling Requires Transient Macrophages in the Liver ». *Nature Medicine* 22(8): 945-51.
- Theurl, Milan et al. 2008. « Kupffer Cells Modulate Iron Homeostasis in Mice via Regulation of Hcpidin Expression ». *Journal of Molecular Medicine* 86(7): 825.
- Thomas, E. D. et al. 1976. « Direct Evidence for a Bone Marrow Origin of the Alveolar Macrophage in Man ». *Science (New York, N.Y.)* 192(4243): 1016-18.

- Thompson, Randall C. et al. 2013. « Atherosclerosis across 4000 Years of Human History: The Horus Study of Four Ancient Populations ». *Lancet (London, England)* 381(9873): 1211-22.
- Tran, Sophie et al. 2020. « Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-Alcoholic Steatohepatitis ». *Immunity* 53(3): 627-640.e5.
- Triantafyllou, Evangelos et al. 2018. « The Role of Monocytes and Macrophages in Acute and Acute-on-Chronic Liver Failure ». *Frontiers in Immunology* 9: 2948.
- . 2021. « PD-1 Blockade Improves Kupffer Cell Bacterial Clearance in Acute Liver Injury ». *The Journal of Clinical Investigation* 131(4): 140196.
- Tsuchida, Takuma, et Scott L. Friedman. 2017. « Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation ». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 14(7): 397-411.
- van der Velde, Astrid E. et al. 2007. « Direct Intestinal Cholesterol Secretion Contributes Significantly to Total Fecal Neutral Sterol Excretion in Mice ». *Gastroenterology* 133(3): 967-75.
- Venkateswaran, A. et al. 2000. « Control of Cellular Cholesterol Efflux by the Nuclear Oxysterol Receptor LXR Alpha ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22): 12097-102.
- « VIDAL ». VIDAL. <https://www.vidal.fr/maladies/coeur-circulation-veines/cholesterol/medicaments.html> (26 juillet 2022).
- Vlahos, Ross, et Steven Bozinovski. 2014. « Role of Alveolar Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease ». *Frontiers in Immunology* 5: 435.
- Wald, David S. et al. 2016. « Child-Parent Familial Hypercholesterolemia Screening in Primary Care ». *New England Journal of Medicine* 375(17): 1628-37.
- Wang, David Q.-H., et Martin C. Carey. 2003. « Measurement of Intestinal Cholesterol Absorption by Plasma and Fecal Dual-Isotope Ratio, Mass Balance, and Lymph Fistula Methods in the Mouse: An Analysis of Direct versus Indirect Methodologies ». *Journal of Lipid Research* 44(5): 1042-59.
- Wang, Jing, et Paul Kubes. 2016. « A Reservoir of Mature Cavity Macrophages That Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair ». *Cell* 165(3): 668-78.
- Wang, Yanan et al. 2015. « Plasma Cholesteryl Ester Transfer Protein Is Predominantly Derived from Kupffer Cells ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 62(6): 1710-22.
- Wang, Yuquan et al. 2018. « Targeted Therapy of Atherosclerosis by a Broad-Spectrum Reactive Oxygen Species Scavenging Nanoparticle with Intrinsic Anti-Inflammatory Activity ». *ACS Nano* 12(9): 8943-60.
- Willekens, Frans L. A. et al. 2005. « Liver Kupffer Cells Rapidly Remove Red Blood Cell-Derived Vesicles from the Circulation by Scavenger Receptors ». *Blood* 105(5): 2141-45.

- Williams, Jesse W. et al. 2020. « Limited Proliferation Capacity of Aortic Intima Resident Macrophages Requires Monocyte Recruitment for Atherosclerotic Plaque Progression ». *Nature Immunology* 21(10): 1194-1204.
- Wlodarczyk, Agnieszka et al. 2015. « Pathologic and Protective Roles for Microglial Subsets and Bone Marrow- and Blood-Derived Myeloid Cells in Central Nervous System Inflammation ». *Frontiers in Immunology* 6: 463.
- Wolf, Monika Julia et al. 2014. « Metabolic Activation of Intrahepatic CD8+ T Cells and NKT Cells Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Cancer via Cross-Talk with Hepatocytes ». *Cancer Cell* 26(4): 549-64.
- Wong, Connie H. Y. et al. 2013. « Nucleation of platelets with bloodborne pathogens on Kupffer cell precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance ». *Nature immunology* 14(8): 785-92.
- Wu, Li-Ling et al. 2019. « Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus C+ Monocytes and Kupffer Cells Orchestrate Liver Immune Responses Against Hepatitis B Virus in Mice ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 69(6): 2364-80.
- Xiong, Xuelian et al. 2019. « Landscape of intercellular crosstalk in healthy and NASH liver revealed by single-cell secretome gene analysis ». *Molecular cell* 75(3): 644-660.e5.
- Yáñez, Alberto et al. 2017. « Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes ». *Immunity* 47(5): 890-902.e4.
- Yang, Chih-Ya et al. 2013. « CLEC4F Is an Inducible C-Type Lectin in F4/80-Positive Cells and Is Involved in Alpha-Galactosylceramide Presentation in Liver ». *PLoS ONE* 8(6): e65070.
- Yao, P. M., et I. Tabas. 2001. « Free Cholesterol Loading of Macrophages Is Associated with Widespread Mitochondrial Dysfunction and Activation of the Mitochondrial Apoptosis Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(45): 42468-76.
- Yee, Steven B., Mohammed Bourdi, Mary Jane Masson, et Lance R. Pohl. 2007. « Hepatoprotective Role of Endogenous Interleukin-13 in a Murine Model of Acetaminophen-Induced Liver Disease ». *Chemical Research in Toxicology* 20(5): 734-44.
- Yona, Simon et al. 2013. « Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis ». *Immunity* 38(1): 79-91.
- You, Qiang et al. 2013. « Role of Hepatic Resident and Infiltrating Macrophages in Liver Repair after Acute Injury ». *Biochemical Pharmacology* 86(6): 836-43.
- Younossi, Zobair M. et al. 2016. « Global Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease- Meta-Analytic Assessment of Prevalence, Incidence, and Outcomes ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 64(1): 73-84.

- Yu, Liqing et al. 2002. « Disruption of Abcg5 and Abcg8 in Mice Reveals Their Crucial Role in Biliary Cholesterol Secretion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(25): 16237-42.
- . 2005. « Expression of ABCG5 and ABCG8 Is Required for Regulation of Biliary Cholesterol Secretion ». *The Journal of Biological Chemistry* 280(10): 8742-47.
- Yu, Mikyung et al. 2017. « Targeted Nanotherapeutics Encapsulating Liver X Receptor Agonist GW3965 Enhance Antiatherogenic Effects without Adverse Effects on Hepatic Lipid Metabolism in *Ldlr*^{-/-} Mice ». *Advanced Healthcare Materials* 6(20): 1700313.
- Yurdagul, Arif et al. 2017. « Mechanisms and Consequences of Defective Efferocytosis in Atherosclerosis ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 4: 86.
- Zeng, Zhutian et al. 2016. « CRIg Functions as a Macrophage Pattern Recognition Receptor to Directly Bind and Capture Blood-Borne Gram-Positive Bacteria ». *Cell Host & Microbe* 20(1): 99-106.
- Zhang, Sunny H., Robert L. Reddick, Jorge A. Piedrahita, et Nobuyo Maeda. 1992. « Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein E ». *Science* 258(5081): 468-71.
- Zhang, Xinbo, William C. Sessa, et Carlos Fernández-Hernando. 2018. « Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5: 130.
- Zhou, X., et G. K. Hansson. 1999. « Detection of B Cells and Proinflammatory Cytokines in Atherosclerotic Plaques of Hypercholesterolaemic Apolipoprotein E Knockout Mice ». *Scandinavian Journal of Immunology* 50(1): 25-30.
- Zigmond, Ehud et al. 2012. « Ly6C Hi Monocytes in the Inflamed Colon Give Rise to Proinflammatory Effector Cells and Migratory Antigen-Presenting Cells ». *Immunity* 37(6): 1076-90.
- . 2014. « Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 193(1): 344-53.

Role of Kupffer cells in cholesterol homeostasis

Abstract

Hypercholesterolemia, characterized by elevated plasma LDL-cholesterol concentrations, can lead to the development of atherosclerosis, the main underlying cause of cardiovascular diseases. The liver, a major organ involved in cholesterol homeostasis, harbors the largest population of resident macrophages, Kupffer cells (KCs) that exert immune sentinel activities and key functions for tissue homeostasis. As KCs identity rely on the transcription factor LXRA, a sensor for cellular cholesterol, we thus sought to explore the relationship linking KCs and cholesterol metabolism in the context of hypercholesterolemia. Using *Ldlr*^{-/-} mice, we observed that following the induction of hypercholesterolemia KCs became massively cholesterol-loaded, in part through scavenger receptor CD36, activating a lipid gene signature resembling that of atherosclerotic foamy macrophages. Concomitantly, the liver density of embryo-derived KCs (EmKCs) rapidly expanded but next their numbers gradually diminished while monocyte-derived KCs (MoKCs) seeded the pool and self-maintained. Interestingly, these moKCs accumulated less amount of cholesterol than emKCs. Besides, depletion of EmKCs while maintaining MoKCs exacerbated hypercholesterolemia and accelerated atherosclerosis development. Altogether, our data reveal that KCs may be new metabolic actors in cholesterol homeostasis and appear to be implicated in the development of atherosclerosis.

Keywords: [Kupffer cell – monocyte-derived macrophage – hypercholesterolemia]

Rôle des cellules de Kupffer dans l'homéostasie du cholestérol

Résumé

L'hypercholestérolémie, caractérisée par des concentrations plasmatiques élevées de cholestérol associé aux LDL, peut conduire au développement de l'athérosclérose, la cause la plus courante des maladies cardiovasculaires. Le foie est un organe clé de l'homéostasie du cholestérol. Il abrite la population la plus large de macrophages résidents, les cellules de Kupffer (KCs), qui exercent des activités d'immuno-surveillance et des fonctions clés pour l'homéostasie du tissu. Alors que l'identité des KCs est dépendante de LXR α , un facteur de transcription qui contrôle le contenu intracellulaire de cholestérol, nous avons cherché à explorer le lien entre les KCs et le métabolisme du cholestérol dans un contexte d'hypercholestérolémie. A partir du modèle murin *Ldlr*^{-/-}, nous avons observé, à la suite de l'induction de l'hypercholestérolémie, que les KCs se chargeaient massivement en cholestérol, notamment via le récepteur scavenger CD36, activant une signature génique semblable à celle des macrophages spumeux de la plaque d'athérosclérose. De façon concomitante, la densité cellulaire des KCs d'origine embryonnaire (EmKCs) augmentait rapidement, mais leur nombre diminuait ensuite graduellement tandis que des KCs dérivées des monocytes (MoKCs) s'implantaient dans le tissu et s'y maintenaient. De façon intéressante, ces MoKCs accumulaient moins de cholestérol que les EmKCs. Par ailleurs, dépléter les EmKCs tout en maintenant la population de MoKCs exacerbait l'hypercholestérolémie et accélérail le développement de l'athérosclérose. Ensemble, nos résultats révèlent que les KCs pourraient être de nouveaux acteurs métaboliques de l'homéostasie du cholestérol et semblent être impliquées dans le développement de l'athérosclérose.

Mots clés: [cellule de Kupffer – macrophage-dérivé des monocytes – hypercholestérolémie]