



HAL
open science

Rôles des cellules de Kupffer dans la physiopathologie hépatique

Ines Baba

► **To cite this version:**

Ines Baba. Rôles des cellules de Kupffer dans la physiopathologie hépatique. Sciences du Vivant [q-bio]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT: . tel-04040917

HAL Id: tel-04040917

<https://hal.science/tel-04040917>

Submitted on 22 Mar 2023

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

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



HAL
open science

Rôles des cellules de Kupffer dans la physiopathologie hépatique

Inès Baba

► **To cite this version:**

Inès Baba. Rôles des cellules de Kupffer dans la physiopathologie hépatique. Maladies infectieuses. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS211 . tel-03828189

HAL Id: tel-03828189

<https://theses.hal.science/tel-03828189>

Submitted on 25 Oct 2022

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

École doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (ED394)

Institute of Cardiometabolism & Nutrition / Mononuclear Phagocytes in Cardiometabolic Diseases

Sorbonne Université / INSERM UMRS 1166

Rôles des cellules de Kupffer dans la physiopathologie hépatique.

Par Ines BABA

Thèse de doctorat de Biologie

Spécialité Immunologie

Dirigée par le Dr Emmanuel Gautier

Présentée et soutenue publiquement le 7 mars 2022

Devant un jury composé de :

Président :	Pr Philippe Le Rouzic
Rapporteurs :	Pr Jean-Pierre Couty Dr Julie Helft
Examineur :	Dr Jean-Philippe Pradère
Directeurs de Thèse :	Dr Emmanuel Gautier Dr Philippe Lesnik

*A mon Papi et à ma tante Khadra,
que vos âmes reposent en paix*

Remerciements

Avant tout, je souhaite remercier chaleureusement les membres du jury pour l'intérêt porté à mes travaux de thèse et d'avoir pris de leur temps pour l'évaluer.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, le **Dr Emmanuel Gautier**. Je te remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir inculqué des valeurs telles que la rigueur dans le travail et la persévérance. Je te remercie aussi pour ta patience et ta disponibilité tout le long de ma thèse. Ces quatre années sous ta direction resteront pour moi une très grande expérience, tant sur le plan professionnel avec toutes ces connaissances acquises grâce à toi, mais également sur le plan humain. Tu es l'archétype du chercheur passionné terriblement exigeant certes mais avant tout avec toi-même et je te souhaite sincèrement de t'épanouir dans l'avenir.

Je remercie également le **Dr Philippe Lesnik** de m'avoir accueilli au sein de son équipe et d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse administratif ☺

Merci également au **Dr Thierry Huby**, mon jumeau astral, pour ta bonne humeur, ton sourire contagieux (tes goûts musicaux en salle de cyto ont adoucies de nombreuses journées de manips). Je te remercie pour tes précieux conseils, tes remarques toujours pertinentes ainsi que ton aide, tu as toujours su être là lorsqu'on en avait besoin.

Merci à mes formidables collègues sans qui ma thèse n'aurait pas été ce qu'elle fut. Toutes ces soirées labo (pré-covid...) autour d'une raclette devant un bon film m'ont redonné du baume au cœur et m'ont permis de tenir dans les moments compliqués.

Haoussa, les mots ne suffisent pas à exprimer la gratitude que je ressens à ton égard. Tu as été mon roc durant ma thèse. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir toujours motivée, d'avoir été une oreille attentive lors des moments difficiles, pour toutes ces soirées passées au labo ensemble (souvent par ma faute je l'avoue, j'ai souvent du mal à décrocher, comme le dit le dicton : ferme un Excel et un autre apparait...) et pour tous ces weekends à bosser toutes les deux. Mes plus gros fous rires de thèse (alimentés surtout par les insomnies et l'abus de caféine) je les ai eus avec toi. Il y a 4 ans tu étais qu'une simple collègue, et aujourd'hui je suis heureuse de te compter comme l'une de mes amies les plus proches. Tiens bon, dans quelques mois c'est ton tour !

Elissa, tu as été d'une aide sans nom durant une grande partie de ma thèse. Ta gentillesse et ta bonne humeur sont sans égal. Tu as été l'une de mes plus belles rencontres. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle vie.

Rébecca, merci pour tous ces bons moments passés ensemble. La majorité d'entre eux ont été autour d'une tasse de thé à discuter des ragots du labo (sauf les mercredis). Ta joie de vivre, tes petites remarques (toujours pleines de bienveillance), ta présence et ton soutien ont beaucoup compté. Ça a été un plaisir de partager mon

stage de M2 puis ma thèse avec toi. Ta générosité et ton énergie n'ont pas de limite (tes talents de pâtissière non plus), je te souhaite que du bonheur pour la suite !

Merci à **Adélaïde** de m'avoir formée dès mon arrivée en M2, ça a été un plaisir de travailler à tes côtés. Merci à **Lucie** d'avoir été là au début de ma thèse, je te remercie pour tous tes conseils tant sur le plan technique que personnel. Merci à **Martine** pour ton expertise, manipuler face à ta paillasse avec ta radio classique en fond a été un réel plaisir, le labo n'est plus le même depuis que tu as pris ta retraite (amplement méritée). Merci **Sébastien**, le roi de l'informatique, pour ton aide à la paillasse et lors des escape game.

Alexandre je te remercie pour ta gentillesse, tes encouragements, et aussi pour le partage de tes recettes à l'heure du déjeuner (je garde celle des cookies bien au chaud). A tous les autres thésards **Pukar, Marie-Aude, Clément**, avec lesquels j'ai passé de très bons moments.

Caroline, je te remercie de prendre la suite de mon projet, reste motivée coûte que coûte et n'oublie pas : plus ça rate, plus il y a de chance que ça marche (je me suis occupée de la 1^{ère} partie, j'espère que tu récolteras que la 2^{ème}). En tout cas, je te souhaite vraiment de t'épanouir au cours de ta thèse, tu es entre de bonnes mains ! Même si nos chemins se sont brièvement croisés, sache que ça a été un plaisir de travailler avec toi, ta personnalité et ton humour ont été une bouffée d'air frais.

Un bon courage à **Raoul, Cheïma et Alice**, les nouveaux du bureau. Je vous souhaite sincèrement de vous épanouir tant dans votre vie professionnelle que personnelle. Je compte sur vous pour maintenir le vivant de ce bureau qui en a vu passé des doctorants ;)

Kathleen, tu es d'un soutien incommensurable depuis plus de 6 ans maintenant (ça ne nous rajeunit pas ☺). Tu m'as toujours encouragée à me dépasser. Tes précieux conseils m'ont en partie permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui, et je t'en remercie sincèrement. Tu es l'une de mes plus belles rencontres, une amie pour la vie sur laquelle je pourrais toujours compter, quoiqu'il puisse arriver. Ton honnêteté, ta gentillesse et ta bienveillance ne sont qu'un aperçu de la multitude de qualités qui te définit. Je te souhaite le meilleur pour la suite (que je suivrai de très près ☺)

Merci à **Camille**, ton passage au labo a été furtif mais nos conversations laisseront une trace dans ma tête pour toujours. Je te remercie pour ton enthousiasme, ta gentillesse, tes idées farfelues, et pour toutes ces discussions à la paillasse sur le sens de la vie. Ma proposition de fonder une association humanitaire toutes les 2 tient toujours ;)

Enfin, au risque d'en oublier certains, merci à tous mes amis qui m'ont apporté leur soutien de près ou de loin durant ces années. **Lisou** qui a été ma voisine de bureau au début de ma thèse, **Estelle** qui a su animer plein de pauses cafés, **Marion** et **Dimitri** (c'est bientôt votre tour !), **Sabrina, Leïla, Rabir, Mégane** et tous les autres. Merci aux copines des poils souillés re-**Adé, Imène, Hélène** et **Elodie** (je clôture le bal des soutenances). Grâce à vous je pense être l'une des rares doctorantes à avoir apprécié la formation d'expérimentation animale.

A ma famille

Mamoune et **Papou**, ma sœur **Imane**, mon frère **Rayan** et mon petit **Badr**. Merci pour votre soutien, merci de m'avoir toujours accompagnée et encouragée, ça y est on va enfin avoir un docteur dans la famille ! Certes pas le genre de docteur qui se lève lorsqu'une hôtesse de l'air demande « y a-t-il un docteur dans l'avion ?? » mais docteure tout de même ;) ... J'espère être à la hauteur de votre fierté inconditionnelle, je vous aime plus que tout.

Merci à ma cousine **Kaouthar**, à **mes oncles** et à **ma belle-famille** qui m'ont toujours soutenue et motivée.

Mes derniers remerciements (et non les moindres) s'adressent à **mon mari, Mohamed**, pour son amour inconditionnel. Dans les moments de doute, tes mots justes ont su me redonner confiance en moi. Tu as fait preuve d'une patience et d'un soutien extraordinaire ces derniers mois. Toi qui es tant avide de voyages, de découvertes et de nouvelles expériences, tu as dû mettre tout de côté pour me soutenir. Tu as toujours été un pilier sur lequel je pouvais me reposer, et je t'en serais à jamais reconnaissante. Je vais m'arrêter de suite au risque de tomber dans le sentimentalisme dégoulinant. Une nouvelle page s'ouvre à nous et j'ai hâte de découvrir ce que le destin nous réserve ! (Namibie, here we come !!! 😊)

Table des illustrations

Figure 1. Développement des monocytes chez la souris.	13
Figure 2. Schéma récapitulatif de la diversité de fonctions des monocytes en conditions physiologiques et pathologiques.	19
Figure 3. Représentation des macrophages résidents de différents tissus chez l'Homme.	21
Figure 4. Représentation de l'hématopoïèse embryonnaire.....	24
Figure 5. Voies de signalisations activées par les TLRs.....	33
Figure 6. Les différentes voies de signalisation du récepteur TLR4.	37
Figure 7. Représentation schématique d'un lobule hépatique.	41
Figure 8. Représentation schématique d'un sinusoiide hépatique.....	44
Figure 9. Modèle actuel du développement des KCs.....	46
Figure 10. Mécanismes de mort cellulaire induits par la cytokine TNF.	53
Figure 11. Spectre de la NAFLD et lésions hépatiques associées.....	60
Figure 12. Cellules de Kupffer dans les lésions hépatiques aiguës.....	65
Figure 13. Diversité de macrophages hépatiques au cours de la NASH.	98

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	2
TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
INTRODUCTION	10
PARTIE 1 – LES MACROPHAGES ET LEURS RECEPTEURS DANS L’IMMUNITE INNEE	10
I. Le système des phagocytes mononucléés	11
I.1. Les monocytes	11
I.1.1. Hétérogénéité des monocytes	11
I.1.2. Développement des monocytes	12
I.1.3. Hématopoïèse extramédullaire et réservoirs de monocytes	15
I.1.4. Recrutement et fonctions des monocytes.....	15
a) Les monocytes non classiques	15
b) Les monocytes classiques.....	16
I.2. Les macrophages	20
I.2.1. Hétérogénéité des macrophages	20
I.2.2. Développement des macrophages	22
a) Développement des macrophages résidents (ResMacs)	23
b) Développement des macrophages dérivés des monocytes (MoDMacs)	28
I.2.3. Différences entre ResMacs et MoDMacs en contexte inflammatoire.....	28
II. Les récepteurs de l’immunité innée.....	30
II.1. Les récepteurs de type NOD (NLRs).....	30
II.2. Les récepteurs de type RIG 1 (RLRs)	31
II.3. Les récepteurs des lectines de type C (CLRs).....	32
II.4. Les récepteurs de type Toll (TLRs)	32
II.4.1. Structure et principes généraux de signalisation.....	34
II.4.2. TLR membranaires et TLR intracellulaires.....	34
II.4.3. Le récepteur TLR4	35
a) Description et expression de TLR4.....	35
b) Ligands de TLR4.....	36
c) Reconnaissance des pathogènes et activation de TLR4.....	36
d) Signalisation de TLR4.....	38
PARTIE 2 – ROLES DES MACROPHAGES DANS LES PATHOLOGIES HEPATIQUES	39
I. Le foie.....	39
I.1. Organisation structurelle	39
I.2. Fonctions hépatiques.....	41
I.2.1. Fonction de détoxification et d’épuration.....	41
I.2.2. Fonction immunitaire.....	42
I.2.3. Fonctions de stockage et de production	42
I.3. Types cellulaires présents dans le foie.....	43
I.4. Les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie.....	45
I.4.1. Ontogénie.....	45
I.4.2. Fonctions des KCs.....	47
I.4.3. Cibler spécifiquement les KCs afin de les étudier.....	48
II. Pathologies hépatiques aiguës et chroniques	50
II.1. Les pathologies hépatiques aiguës (Acute Liver Failure, ALF).....	50
II.1.1. Définition.....	50
II.1.2. Causes de l’ALF	51
II.1.3. Physiopathologie de l’ALF.....	52
II.1.4. Traitements de l’ALF	54
II.1.5. Modèles murins de l’ALF.....	54
a) ALF induite par une surdose en acétaminophène	55
b) ALF induite par l’activation du récepteur de mort Fas	55
c) ALF induite par le traitement LPS – D-Galactosamine	56
II.2. L’insuffisance hépatique aigüe sur maladie chronique	57
II.3. La stéatohépatite non-alcoolique (NASH) comme prototype des pathologies hépatiques chroniques	58
II.3.1. Épidémiologie	58
II.3.2. Spectre de la NAFLD.....	59
II.3.3. Physiopathologie de la NASH.....	60
II.3.4. Modélisation de la NASH.....	61

<i>II.4. Les macrophages dans les pathologies hépatiques</i>	63
II.4.1. Les macrophages hépatiques dans les pathologies aiguës	63
II.4.2. Les macrophages hépatiques dans la NASH.....	66
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	69
RESULTATS	70
CONCLUSION ET DISCUSSION	98
PROJET ANNEXE – ROLE OF KUPFFER CELLS-MEDIATED INFLAMMATION IN ACUTE LIVER INJURY	101
VALORISATION DES RESULTATS DE LA THESE	111
BIBLIOGRAPHIE	113

Résumé

Les cellules de Kupffer (KCs) sont des macrophages résidents du foie qui se maintiennent, en conditions d'homéostasie, par prolifération locale, indépendamment des monocytes circulants. En revanche, la manière dont ces cellules se maintiennent dans un contexte pathologique comme lors de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) demeurait jusqu'ici mal définie. Grâce à notre étude, nous avons découvert qu'au cours de la NASH, une fraction des KCs dérivait des monocytes Ly-6C⁺ ce qui témoigne d'une altération de la capacité des KCs à s'auto-renouveler. Nous avons pu montrer qu'en réponse à la mort des KCs d'origine embryonnaire (EmKCs), les KCs dérivées des monocytes (MoKCs) repeuplaient progressivement le pool de KCs, au fur et à mesure que la maladie progressait. La caractérisation des MoKCs a permis de mettre en avant leur profil immature ainsi que leur statut pro-inflammatoire en comparaison aux EmKCs. Toutefois, ces MoKCs sont capables de se maintenir sur le long terme, après la régression de la pathologie, et d'acquérir des marqueurs des EmKCs. Alors que les KCs dans leur globalité favorisent le stockage des triglycérides hépatiques au cours de la NASH, nous avons constaté que les EmKCs le favorisent de manière plus efficace que les MoKCs. Les MoKCs favorisent par ailleurs la souffrance hépatique durant la NASH. Ainsi, nos résultats mettent en évidence les différences fonctionnelles entre les MoKCs et leurs homologues d'origine embryonnaire. Nos données révèlent que l'homéostasie des KCs est altérée au cours de la NASH, modifiant la réponse du foie aux lipides.

Mots clés : macrophages, cellules de Kupffer, monocytes, stéatohépatite non alcoolique (NASH)

Summary

Kupffer cells (KCs) are liver-resident macrophages that, under homeostatic conditions, self-renew by local proliferation in the adult independently from circulating monocytes. However, how these cells are maintained in liver diseases such as during non-alcoholic steatohepatitis (NASH) remains ill defined. Our study revealed that a fraction of KCs was derived from Ly-6C⁺ monocytes during NASH, underlying impaired KC self-renewal. We discovered that monocyte-derived KCs (MoKCs) were generated in response to embryo-derived KCs (EmKCs) death and MoKCs gradually seeded the KC pool as disease progressed. MoKCs characterization highlighted their immature phenotype as well as their heightened pro-inflammatory status compared to EmKCs. Importantly, MoKCs engrafted the KC pool for the long term as they remained following disease regression while acquiring mature EmKC markers. While KCs as a whole favored hepatic triglyceride storage during NASH, EmKCs promoted it more efficiently than MoKCs. In addition, MoKCs were found to fuel liver damage during NASH. Thus, our results highlighted the functional differences between MoKCs and their embryonic counterparts. Our data reveal that KC homeostasis is impaired during NASH, altering the liver response to lipids.

Key words: Macrophages, Kupffer cells, monocytes, non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

Introduction

Partie 1 – Les macrophages et leurs récepteurs dans l'immunité innée

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des processus et des mécanismes de défense mobilisés par notre organisme pour lutter contre les pathogènes. Ce système complexe dispose de deux lignes de défense fondamentales : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée représente la première ligne de défense contre les pathogènes et comporte en premier lieu des barrières structurelles, telles que la peau ou les muqueuses. La réponse immunitaire innée est ensuite orchestrée par des cellules spécialisées comme les monocytes, les neutrophiles ou les macrophages qui sont capables d'initier 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 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 réexposition à l'antigène. Une grande synergie existe entre le système immunitaire inné et adaptatif.

Les mécanismes de défense innée mis en place par l'organisme mènent au développement d'une réponse inflammatoire qui est bénéfique lorsqu'elle est contrôlée et qu'elle permet le retour à un état homéostatique. En revanche, lorsque cette réponse perdure, comme dans le cas des maladies inflammatoires chroniques, elle peut alors devenir nuisible à l'échelle du tissu touché mais également de l'organisme. La première étape d'une réponse inflammatoire consiste en la reconnaissance de signaux exogènes ou endogènes. Les cellules immunitaires, notamment les phagocytes comme les monocytes et les macrophages, expriment à leur surface divers récepteurs qui permettent de reconnaître aussi bien des signaux issus de pathogènes que des signaux de dangers endogènes relargués au cours de la réponse inflammatoire, comme lors des maladies métaboliques chroniques. Une fois activés, les phagocytes sécrètent divers médiateurs inflammatoires tels que des cytokines et des chimiokines, qui permettent d'orchestrer la réponse inflammatoire.

Les phagocytes jouent ainsi un rôle central dans la mise en place et le contrôle de la réponse immunitaire.

I. Le système des phagocytes mononucléés

Les phagocytes mononucléés (PMs) représentent une famille de cellules myéloïdes disséminées dans l'organisme. Les PMs sont caractérisés par leur activité phagocytaire ainsi que leur rôle dans le déclenchement et l'entretien des réponses immunitaires. Ils constituent un groupe hétérogène de cellules incluant les monocytes, les macrophages ainsi que les cellules dendritiques (DCs). Nous nous concentrerons ici plus particulièrement sur les monocytes et les macrophages qui font l'objet de mes travaux de thèse.

I.1. Les monocytes

Les monocytes sont des cellules myéloïdes circulant dans le sang. Ils constituent environ 10% des leucocytes périphériques chez l'homme et environ 5% chez la souris. Les monocytes sont générés dans la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse. Après leur génération, ils sont libérés dans la circulation sanguine où ils peuvent exercer leurs fonctions physiologiques. L'une des caractéristiques principales des monocytes est leur capacité à être rapidement mobilisés en grand nombre vers les sites inflammatoires. Suite à leur entrée au site inflammatoire, les monocytes produisent *in situ* des médiateurs inflammatoires puis se différencient en macrophages souvent fonctionnellement distincts des macrophages préexistant dans le tissu et qualifiés de résidents.

I.1.1. Hétérogénéité des monocytes

L'hétérogénéité des monocytes a pu être mise en évidence au sein de différentes espèces (Ziegler-Heitbrock, 2014), notamment chez l'homme (Passlick et al., 1989) et chez la souris (Geissmann et al., 2003) grâce à la cytométrie en flux. Chez l'homme, diverses populations de monocytes sont caractérisées par l'expression différentielle de marqueurs de surface CD14 et CD16. On distingue ainsi principalement 3 sous-

ensembles de monocytes humains : les monocytes classiques (CD14⁺ CD16⁻), intermédiaires (CD14⁺ CD16⁺) et non classiques (CD14^{low} CD16⁺) (Villani et al., 2017). Les monocytes classiques sont largement majoritaires car ils représentent 80 à 90% du pool de monocytes.

Chez la souris, les monocytes circulants sont identifiés par l'expression de CD115 et peuvent également être subdivisés en monocytes classiques, caractérisés par l'expression des marqueurs de surface Ly-6C, CCR2 et CD62L, et non classiques, définis comme Ly-6C^{low}, CCR2^{low}, CD62L⁻ CD43⁺.

Une comparaison transcriptionnelle entre les sous-populations de monocytes humains et murins a permis de montrer que les monocytes Ly-6C⁺ de la souris correspondent aux monocytes CD14⁺ CD16⁻ humains et que les monocytes Ly-6C⁻ murins s'apparentent aux monocytes CD14^{low} CD16⁺ humains. Cependant, certaines différences d'expression génique et de marqueurs de surface existent. Il a ainsi été montré que les populations de monocytes murins et humains présentent des différences d'expression de gènes impliqués dans l'activité phagocytaire (Cros et al., 2010; Ingersoll et al., 2010). Il existe enfin une différence dans la répartition des sous-populations de monocytes au sein de ces espèces. Chez l'homme, on retrouve une forte majorité de monocytes classiques alors que chez la souris les monocytes Ly-6C⁺ et Ly-6C⁻ sont représentés de manière égale.

1.1.2. Développement des monocytes

Les monocytes sont générés à partir de précurseurs présents dans le foie foetal et la moelle osseuse au cours de l'hématopoïèse embryonnaire et adulte, respectivement (Guilliams et al., 2018a). Un modèle de différenciation hiérarchique a été proposé comme étant à l'origine de la génération des monocytes. Selon ce modèle, une fraction de cellules souches hématopoïétiques (CSH) se différencie en progéniteur myéloïde commun (CMP, common myeloid progenitor). Les CMP vont à leur tour se différencier en progéniteurs de granulocytes et de macrophages (GMP, granulocyte/macrophage progenitor) (Akashi et al., 2000). Au sein du GMP, il a été identifié un progéniteur des monocytes et des DCs, le MDP (macrophage/dendritic cell progenitor). Plus récemment, il a été montré que le MDP génère des progéniteurs monocytaires communs unipotents (cMoP, common monocyte progenitor) (Hettinger et al., 2013).

Ainsi, selon ce modèle, les cMoP donneraient naissance directement aux monocytes Ly-6C⁺ et Ly-6C⁻ (Hettinger et al., 2013).

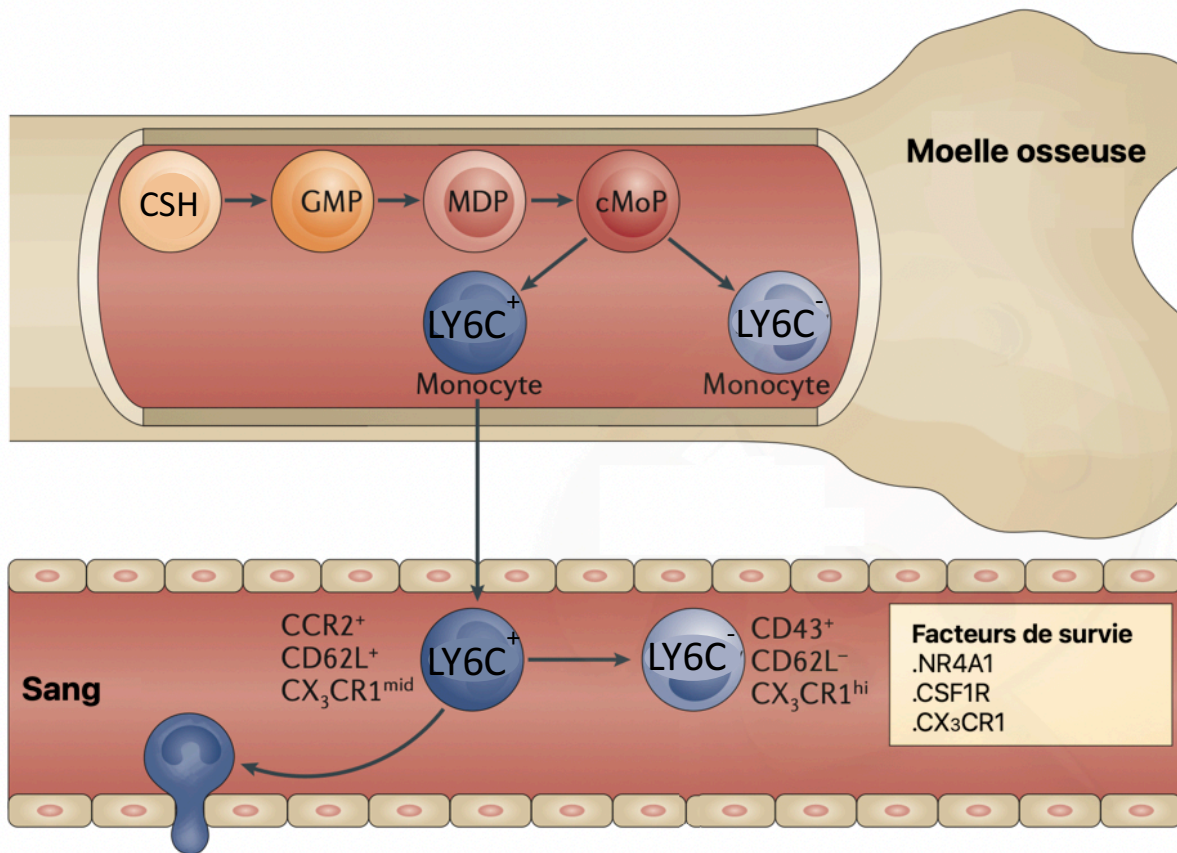


Figure 1. Développement des monocytes chez la souris.

Les monocytes sont générés dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH se différencient en GMP (granulocyte/macrophage progenitor) qui donne naissance au MDP (macrophage/dendritic cell progenitor). Le MDP génère à son tour le cMoP (common monocyte progenitor), précurseur des monocytes Ly-6C⁺ et Ly-6C⁻. Une fois générés dans la moelle osseuse, les monocytes Ly-6C⁺ rejoignent la circulation de manière CCR2 dépendante et peuvent ensuite être mobilisés dans les tissus. Les monocytes Ly-6C⁺ peuvent aussi donner naissance aux monocytes Ly-6C⁻ qui vont demeurer dans les vaisseaux. Adapté de (Ginhoux and Jung, 2014).

Toutefois, ce modèle a été contesté dans plusieurs études affirmant que certains précurseurs s'engageraient vers la lignée monocyttaire à un stade plus précoce. Ainsi, des expériences de transfert adoptif suggèrent que les monocytes Ly-6C⁺ peuvent émerger directement des GMP et des MDP (Yáñez et al., 2017). Ainsi, les monocytes semblent pouvoir être générés à partir de différents précurseurs.

L'engagement vers la lignée monocyttaire dépend majoritairement du facteur de croissance CSF1 (colony stimulating factor 1), aussi connu sous le nom de M-CSF.

Chez la souris, une déficience en ce facteur de croissance ou en son récepteur CSF1R résulte en une grave déficience en monocytes (Cecchini et al., 1994; Dai et al., 2002). Le développement des monocytes est contrôlé par divers facteurs de transcription tels que C/EBP β (CCAAT/enhancer binding protein beta), KLF4 (Kruppel-like factor 4) et NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1) (Terry and Miller, 2014). Le facteur de transcription C/EBP β est essentiel pour la survie des monocytes Ly-6C- (Mildner et al., 2017) et agit en régulant l'expression de Nr4a1 (Tamura et al., 2017; Thomas et al., 2016), ce dernier étant également connu pour contrôler la survie des monocytes Ly-6C- (Hanna et al., 2011). En effet, l'invalidation de Nr4a1 dans la lignée myéloïde conduit à une déplétion des monocytes Ly-6C-. La survie des monocytes Ly-6C+ semble aussi dépendre de ce facteur mais à moindre mesure (Hanna et al., 2011). Le développement des monocytes Ly-6C+ repose surtout sur le facteur de transcription KLF4 (Alder et al., 2008), dont l'expression est régulée par les facteurs IRF8 (interferon regulatory factor 8) et PU.1 (Kurotaki et al., 2013; Terry and Miller, 2014). En effet, il a été montré que l'invalidation du gène Klf4 dans les cellules hématopoïétiques empêche leur différenciation en monocytes Ly-6C+ et induit également une réduction du nombre de monocytes Ly-6C- dans la moelle osseuse ainsi que dans la circulation (Feinberg et al., 2007).

Une fois générés dans la moelle osseuse, les monocytes rejoignent la circulation sanguine grâce à leur récepteur CCR2. Chez les souris déficientes en CCR2, on constate ainsi un nombre de monocytes Ly-6C+ circulants très réduits, ces derniers restant bloqués dans la moelle osseuse. Une fois dans la circulation, les monocytes Ly-6C+ peuvent donner naissance aux monocytes Ly-6C- (Yona et al., 2013). Cette transition est facilitée par l'induction des facteurs de transcription C/EBP β et Nr4a1 mentionnés ci-dessus. D'autres mécanismes sont impliqués dans la conversion des monocytes Ly-6C+ en Ly-6C- comme la production de DLL1 (Notch Ligand Delta-Like 1) par les cellules endothéliales qui va agir sur le récepteur NOTCH2 des monocytes Ly-6C+ et promouvoir cette conversion (Gamrekelashvili et al., 2016).

1.1.3. Hématopoïèse extramédullaire et réservoirs de monocytes

Bien que la moelle osseuse soit considérée comme l'organe de référence pour la génération de monocytes adultes, la rate constitue également un réservoir périphérique important pour les monocytes Ly-6C⁺ et Ly-6C⁻ (Hettinger et al., 2013). Les pools de monocytes spléniques seraient même plus nombreux que leurs homologues circulants (Swirski et al., 2009). Le phénotype des monocytes présents dans la rate est globalement très proche de celui des monocytes du sang. Ils peuvent tous deux être mobilisés lors d'un épisode inflammatoire et être rapidement recrutés au niveau des tissus lésés. Cela a notamment pu être observé au cours de l'athérosclérose (Robbins et al., 2012) ou lors d'ischémies du myocarde (van de Laar et al., 2016; Swirski et al., 2009). Contrairement à leurs homologues circulants, les monocytes spléniques ne requièrent pas l'expression de CCR2 afin de rejoindre la circulation.

La contribution précise des monocytes libérés par les différents réservoirs au pool de monocytes recrutés dans les tissus lésés reste encore mal connue. Des travaux supplémentaires sont requis afin de mieux appréhender le rôle de ces réservoirs, notamment de la rate, et les facteurs déterminant la différenciation des monocytes spléniques ainsi que leur recrutement.

1.1.4. Recrutement et fonctions des monocytes

a) Les monocytes non classiques

- *Conditions physiologiques*

Les monocytes non classiques ont une durée de vie d'environ 2 jours chez la souris et de 7 jours chez l'homme (Patel et al., 2017; Yona et al., 2013), et celle-ci est plus longue que les monocytes classiques. Plusieurs études suggèrent que la fonction principale des monocytes Ly-6C⁻ est de surveiller l'intégrité de l'endothélium. Des études de microscopie intravitale ont ainsi révélé que les monocytes Ly-6C⁻ surveillaient continuellement le système vasculaire en conditions physiologiques (Auffray et al., 2007; Carlin et al., 2013). Ce rôle de surveillance est assuré grâce à un mécanisme d'adhésion dépendant de l'intégrine LFA-1 (Lymphocyte function-

associated antigen 1) monocytaire en interaction avec ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) présent à la surface des cellules endothéliales (Auffray et al., 2007; Carlin et al., 2013). Les monocytes Ly-6C⁻ jouent un rôle de patrouilleur dans les capillaires, les artérioles et les veinules. Cette caractéristique leur permet d'éliminer de manière efficace les microparticules lumenales en conditions physiologiques et ainsi d'assurer la surveillance de l'intégrité des cellules endothéliales (Cros et al., 2010). De manière similaire, il a été montré que les monocytes non classiques humains CD14^{low} CD16⁺ se caractérisaient par ce comportement de patrouilleur (Cros et al., 2010).

- *Conditions pathologiques*

La fonction des monocytes Ly-6C⁻ au cours de l'inflammation demeure controversée. Il a été suggéré, bien que rarement, que les monocytes classiques pouvaient infiltrer un tissu lésé (Arnold et al., 2007). Toutefois, il est possible que les monocytes Ly-6C⁻ détectés soient des monocytes Ly-6C⁺ en cours de différenciation en macrophages et qui perdaient alors leur expression de Ly-6C (Arnold et al., 2007; Avraham-Davidi et al., 2013; Zigmond et al., 2012).

Il semble donc que leur rôle intravasculaire prédomine. Ainsi, dans un contexte inflammatoire induit par des signaux de danger spécifiques au récepteur TLR7, il a été montré que les monocytes Ly-6C⁻ étaient capables de phagocyter les débris cellulaires résultant d'une nécrose endothéliale (Carlin et al., 2013). Dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, les monocytes Ly-6C⁻ peuvent aussi éliminer la protéine β -amyloïde, à l'origine de la dégénérescence neuronale, qui est présente dans la lumière des vaisseaux (Michaud et al., 2013).

Ainsi les monocytes Ly-6C⁻ jouent un rôle majeur dans la surveillance vasculaire grâce à leur localisation stratégique en assurant une fonction de patrouilleurs circulants.

b) Les monocytes classiques

Les monocytes classiques représentent une population cellulaire transitoire au potentiel de différenciation diversifié. Contrairement aux monocytes non classiques, les monocytes classiques sont dotés d'un programme d'expression génique qui leur permet de migrer dans les tissus.

- *Conditions physiologiques*

Les monocytes classiques ont une durée de vie relativement courte dans la circulation sanguine. Une fois libérés dans la circulation sanguine, ils circulent pendant environ un jour et peuvent alors rejoindre des tissus comme l'intestin (Bain et al., 2013, 2014; Tamoutounour et al., 2012; Zigmond et al., 2012), le derme (Tamoutounour et al., 2013), le cœur (Epelman et al., 2014a; Molawi et al., 2014), le pancréas (Calderon et al., 2015) ou le testicule (Mossadegh-Keller et al., 2017) afin d'y repeupler certains pool de macrophages résidents. S'ils ne migrent pas vers un tissu, les monocytes classiques peuvent aussi se convertir en monocytes non classiques dans la circulation (Patel et al., 2017; Yona et al., 2013). Par ailleurs, une étude a montré que les monocytes pourraient coloniser certains tissus et y demeurer à l'état indifférencié. Ces monocytes tissulaires présentaient une augmentation du niveau d'expression du MHC-II et de CCR7 suite à leur interaction avec l'endothélium, suggérant qu'ils pourraient jouer un rôle dans la surveillance immunitaire, notamment dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques (Jakubzick et al., 2013). Les monocytes Ly-6C⁺ se caractérisent donc par leur grande plasticité.

- *Conditions pathologiques*

Les monocytes peuvent influencer le développement de diverses pathologies de par leurs fonctions effectrices variées telles que leurs activités pro- et anti-inflammatoires, qui peuvent influencer le remodelage tissulaire, ou leur capacité à présenter des antigènes.

L'importance des monocytes Ly-6C⁺ a été rapportée dans divers contextes pathologiques et notamment les maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques (modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, EAE) (Fife et al., 2000; Izikson et al., 2002). Au cours de l'EAE, les monocytes Ly-6C⁺ sont mobilisés à partir de la circulation et affluent rapidement dans la moelle épinière. Les souris déficientes pour le récepteur CCR2, et donc dépourvues de monocytes Ly-6C⁺ circulants, sont résistantes à l'induction de l'EAE, démontrant le rôle pathogène des monocytes Ly-6C⁺ au cours de l'EAE (Ajami et al., 2011; King et al., 2009; Mildner et al., 2009). Il a également été montré que les souris invalidées pour *Csf2* (codant pour le GM-CSF) étaient complètement protégées de l'induction de l'EAE (McQualter et al., 2001). Même si le GM-CSF n'est pas directement impliqué dans la génération des

monocytes (Hibbs et al., 2007), il détermine la fonction des cellules dérivées des monocytes en conditions pathologiques. L'inactivation de *Csf2r*, le récepteur au GM-CSF, dans la lignée monocyttaire a permis de démontrer que la signalisation induite par le GM-CSF contrôlait l'initiation de l'EAE en permettant la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires par les cellules dérivées des monocytes (Croxford et al., 2015).

Une autre fonction effectrice des monocytes Ly-6C⁺ a préalablement été mise en évidence via l'étude des Tip-DC (TNF/iNOS-producing dendritic cells) produisant du TNF et de l'oxyde nitrique (NO). Ces cellules ont à l'origine été identifiées lors d'une infection par la bactérie *Listeria monocytogenes* (Serbina et al., 2003), puis également détectées lors d'infections par *Trypanosoma brucei* (Bosschaerts et al., 2010; Guilliams et al., 2009), *Toxoplasma gondii* (Dunay et al., 2008) ou *Leishmania major* (Trez et al., 2009). Ces cellules, qui dérivent des monocytes Ly-6C⁺, se caractérisent par leur expression de CD11c, du MHC-II et de Ly-6C, ainsi que leur production de TNF et de NO. Bien que ces cellules aient été préalablement décrites comme des DCs, de par leur expression des marqueurs CD11c et MHC-II, leur contribution à l'activation des lymphocytes T CD4⁺ lors de l'infection par *Listeria* semble négligeable (Serbina et al., 2003). Par conséquent, le terme Tip-DC est trompeur et il s'agit en fin de compte de monocytes Ly-6C⁺ activés. Ces cellules jouent un rôle important dans l'élimination des agents pathogènes. Ainsi, chez des souris dépourvues de monocytes Ly-6C⁺ capables de produire du TNF et du NO, l'élimination des pathogènes comme *Listeria*, *Toxoplasma* ou *Leishmania* est diminuée (Dunay et al., 2008; Serbina et al., 2003; Trez et al., 2009). Ces observations montrent que les macrophages résidents seuls ne suffisent pas à éliminer les agents pathogènes et qu'ils requièrent l'aide des monocytes recrutés. Il convient de noter que l'accumulation prolongée et l'activation de monocytes Ly-6C⁺ effecteurs au cours d'infections chroniques peuvent également contribuer à des dommages tissulaires collatéraux (Guilliams et al., 2009). Certaines infections chroniques pourraient donc bénéficier de la suppression de l'inflammation induite par les monocytes afin de limiter les symptômes pathologiques.

Dans la plupart des cas d'inflammation stérile, c'est-à-dire non causée par un agent infectieux, les monocytes Ly-6C⁺ semblent aggraver la pathologie. Par exemple, dans le cas de l'athérosclérose, ils participent au développement des plaques d'athérome en étant à l'origine des macrophages qui s'accumulent dans l'intima des artères. Ces macrophages phagocytent les lipides présents en excès dans l'artère et aggravent la

pathologie en produisant des cytokines inflammatoires et des chimiokines qui attirent d'autres monocytes (Woollard and Geissmann, 2010). Dans d'autres maladies métaboliques chroniques comme l'obésité, les monocytes participent aussi à l'inflammation, dite de bas grade, du tissu adipeux en se différenciant en macrophages. Ces macrophages s'accumulent dans le tissu (Oh et al., 2012) et sécrètent de nombreuses cytokines et chimiokines telles que l'IL-1 β et CCL2 (Nagareddy et al., 2014).

Ainsi l'ensemble de ces exemples souligne le rôle essentiel des monocytes Ly-6C+ en conditions physiologiques et physiopathologiques.

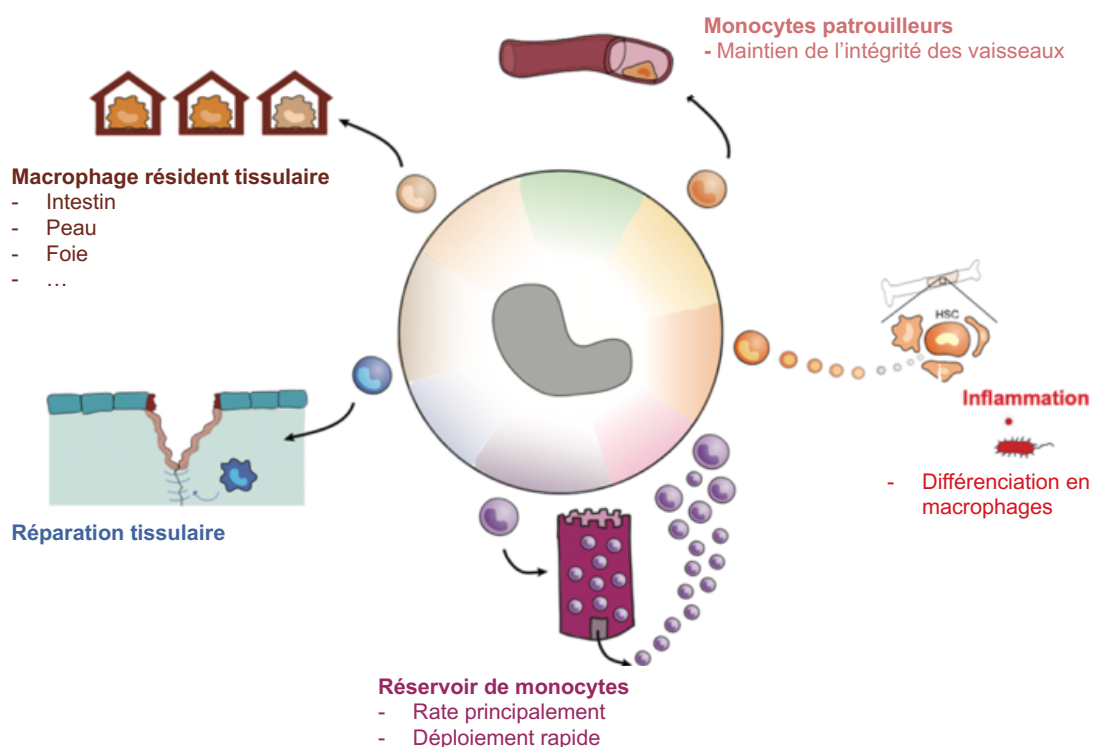


Figure 2. Schéma récapitulatif de la diversité de fonctions des monocytes en conditions physiologiques et pathologiques.

En condition physiologique, les monocytes peuvent contribuer au pool de macrophages résidents au sein de certains tissus, ou se différencier en monocytes non classiques patrouilleurs des vaisseaux ou encore se constituer en un réservoir comme dans la rate. En conditions pathologiques, les monocytes peuvent être recrutés dans le tissu inflammé où ils peuvent se différencier en macrophages inflammatoires. Ils peuvent également participer à la réparation tissulaire.

Adapté de (Guilliams et al., 2018b)

1.2. Les macrophages

Les macrophages sont des cellules myéloïdes stratégiquement positionnées dans les tissus de l'organisme où elles phagocytent et dégradent, en autres, les débris cellulaires et des agents étrangers à l'organisme. Les macrophages jouent un rôle central dans l'homéostasie des tissus mais aussi dans l'orchestration des processus inflammatoires. Ces phagocytes, tout en protégeant l'organisme contre les infections, remplissent également diverses fonctions essentielles, et parfois spécifiques, au sein des tissus dans lesquels ils résident. Néanmoins, ils peuvent aussi contribuer à la pathophysiologie de multiples maladies inflammatoires chroniques comme les maladies métaboliques ou le cancer.

Des macrophages résidents sont présents dans les tissus en conditions physiologiques et peuvent être accompagnés de macrophages inflammatoires dérivés des monocytes dans un contexte pathologique. Pendant des décennies, il a été admis que les macrophages résidents des tissus étaient continuellement repeuplés par les monocytes circulants (van Furth et al., 1972). Cependant, comme discuté plus haut, plusieurs études ont récemment révélé que la contribution des monocytes aux populations de macrophages résidents semblait être limitée à quelques tissus spécifiques à l'état d'homéostasie chez l'adulte. Les macrophages peuvent donc être d'origines variées. Il existe également une grande diversité d'un point de vue transcriptionnel parmi les macrophages résidents présents dans différents tissus (Gautier et al., 2012), ce qui explique leur diversité de fonction. Dans cette partie nous discuterons de l'hétérogénéité des macrophages, de leurs origines développementales diverses ainsi que de la diversité de phénotype et de fonction entre les macrophages résidents tissulaires et les macrophages inflammatoires dérivés des monocytes.

1.2.1. Hétérogénéité des macrophages

Les macrophages sont présents dans tous les tissus. Leurs différences phénotypiques et leurs spécialisations fonctionnelles dans des microenvironnements tissulaires spécifiques expliquent leur hétérogénéité (Epelman et al., 2014a, 2014b; Gordon and Taylor, 2005; Haldar and Murphy, 2014). L'hétérogénéité des macrophages résidents est le résultat de la combinaison de signaux reçus lors de leur genèse et qui impactent

leur identité tissulaire et leur différenciation locale (Davies et al., 2013; Gautier et al., 2012). Ainsi, le phénotype des macrophages résidents semble s'adapter aux besoins du tissu dans lequel ils résident.

Les macrophages résidents prennent différents noms en fonction de leurs localisations tissulaires et de leurs fonctions spécialisées. Par exemple, les macrophages osseux sont connus sous le nom d'ostéoclastes et sont hautement spécialisés dans la résorption osseuse (Boyle et al., 2003). Les macrophages de la moelle osseuse jouent eux un rôle crucial dans la rétention des cellules souches hématopoïétiques au sein de la moelle (Chow et al., 2011). Dans le cerveau, les macrophages résidents sont connus sous le nom de microglie et ils participent notamment au développement du cerveau (Parkhurst et al., 2013; Schafer et al., 2012).

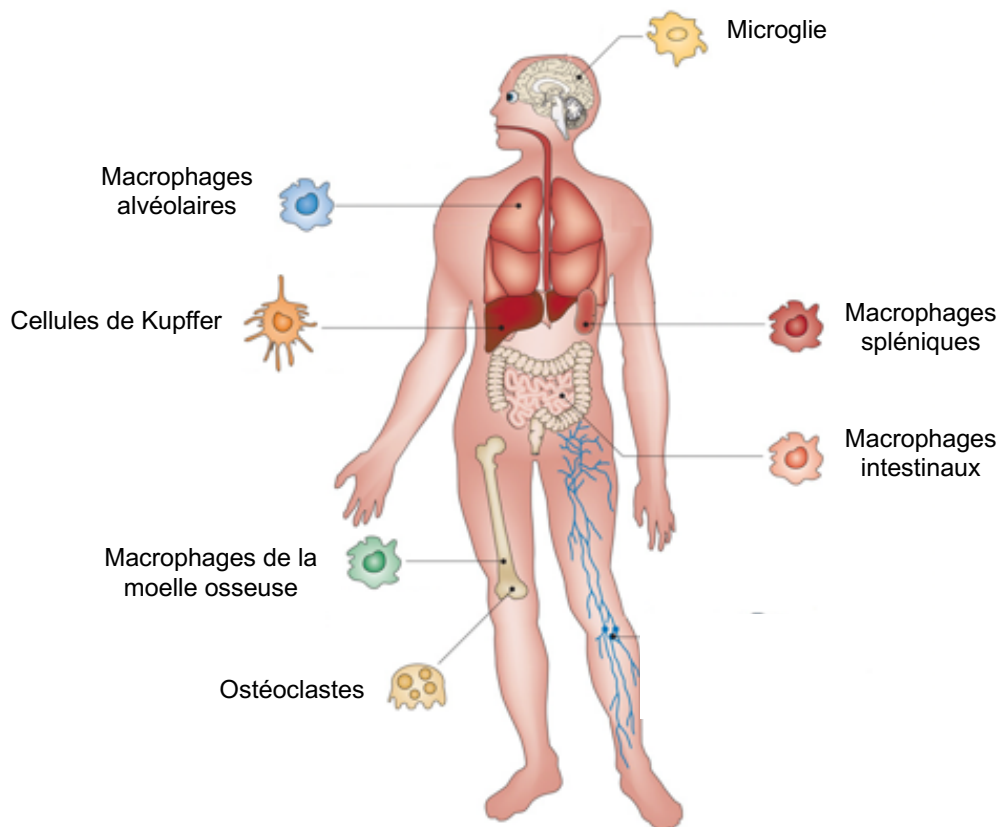


Figure 3. Représentation des macrophages résidents de différents tissus chez l'Homme.

Une grande diversité réside au sein des macrophages résidents présents dans différents tissus. Leur positionnement stratégique dans l'organisme leur permet d'assurer leurs nombreuses fonctions telles que la phagocytose et la dégradation des corps étrangers.

Adapté de (Murray and Wynn, 2011)

Le rôle des macrophages est également essentiel dans le poumon, organe constamment exposé aux irritants et aux microbes présents dans l'air. Environ 90% de la population des macrophages pulmonaires est constituée des macrophages alvéolaires, situés dans les espaces alvéolaires comme leur nom l'indique. Ces macrophages sont responsables du recyclage du surfactant (Hussell and Bell, 2014; Thomas et al., 1976). Dans la rate, les macrophages de la pulpe rouge sont impliqués dans le recyclage de l'hème et du fer qu'ils ingèrent après phagocytose des érythrocytes sénescents (Kohyama et al., 2009). Les macrophages de la zone marginale splénique sont quant à eux importants pour la capture d'antigènes circulants dans le sang (Aichele et al., 2003). Dans l'intestin les macrophages présents dans la muqueuse musculieuse s'engagent dans un dialogue avec les cellules musculaires environnantes et les neurones entériques afin d'assurer un péristaltisme intestinal normal (Muller et al., 2014). Les macrophages présents sous la barrière épithéliale de l'intestin assurent eux la surveillance du tissu et du contenu luminal, et sont également connus pour produire de grandes quantités d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. Enfin, les macrophages résidents du foie, qui font l'objet de mes travaux de thèse et qui se nomment cellules de Kupffer (KCs), assurent une protection contre les infections sanguines et participeraient au maintien de l'homéostasie du fer (Eckert et al., 2015). Ainsi, en raison de leurs origines diverses et de l'influence des microenvironnements spécifiques aux tissus, une grande hétérogénéité réside au sein des macrophages présents dans les tissus. Cette hétérogénéité de fonction peut notamment parfois s'expliquer par des différences dans l'origine de ces populations de macrophages.

1.2.2. Développement des macrophages

Les macrophages résidents sont considérés principalement comme issus de l'hématopoïèse embryonnaire et ils colonisent les différents tissus avant la naissance ou au stade périnatal. Ces macrophages d'origine embryonnaire se maintiennent par prolifération locale. Toutefois, dans certains tissus, le pool de macrophages résidents nécessite la contribution des monocytes circulants afin de se maintenir au stade adulte. Toujours chez l'adulte, les macrophages inflammatoires dérivés des monocytes sont issus de l'hématopoïèse définitive post-natale. Toutes ces populations de macrophages peuvent ainsi parfois cohabiter dans un tissu donné. Ces différences

d'origine ont contribué non seulement à une distinction primaire en termes d'ontogénie mais qui peut aussi se traduire en termes de fonction.

a) Développement des macrophages résidents (ResMacs)

Les macrophages résidents d'origine embryonnaire

Au début des années 2000, des expériences de fate-mapping couplées à l'utilisation de souris parabiotiques ou de modèles murins génétiquement modifiés ont permis de revisiter l'ontogénie des macrophages résidents (Ajami et al., 2007; Bain et al., 2014; Epelman et al., 2014a, 2014b; Ginhoux et al., 2010; Guilliams et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Tamoutounour et al., 2013; Yona et al., 2013). Ces études ont démontré que la microglie, les macrophages alvéolaires et les cellules de Kupffer, notamment, dérivait de précurseurs embryonnaires qui ont colonisé les tissus avant la naissance (Ginhoux and Guilliams, 2016a; Ginhoux and Jung, 2014; Hoeffel and Ginhoux, 2018). A l'âge adulte, ces macrophages résidents se maintiennent localement par prolifération *in situ* (Gentek et al., 2014; Sieweke and Allen, 2013).

L'hématopoïèse embryonnaire des mammifères est un processus complexe. Déterminer l'ontogénie précise des macrophages issus de progéniteurs fœtaux est donc particulièrement difficile. Chez la souris, l'hématopoïèse embryonnaire est caractérisée par des vagues distinctes se produisant dans différentes zones de l'embryon et de manière séquentielle. La première vague émane des îlots sanguins du sac vitellin vers le jour embryonnaire 7-7,5 (E7-E7,5) et donne naissance aux progéniteurs érythro-myéloïdes (EMPs). Cette phase appelée « hématopoïèse primitive » est capable de générer des macrophages sans passer par un progéniteur monocyttaire (Gomez Perdiguero et al., 2015). Ces EMPs ont par la suite été renommés « EMPs précoces » afin de les distinguer des « EMPs tardifs » qui proviennent de l'endothélium du sac vitellin à E8-E8,5.

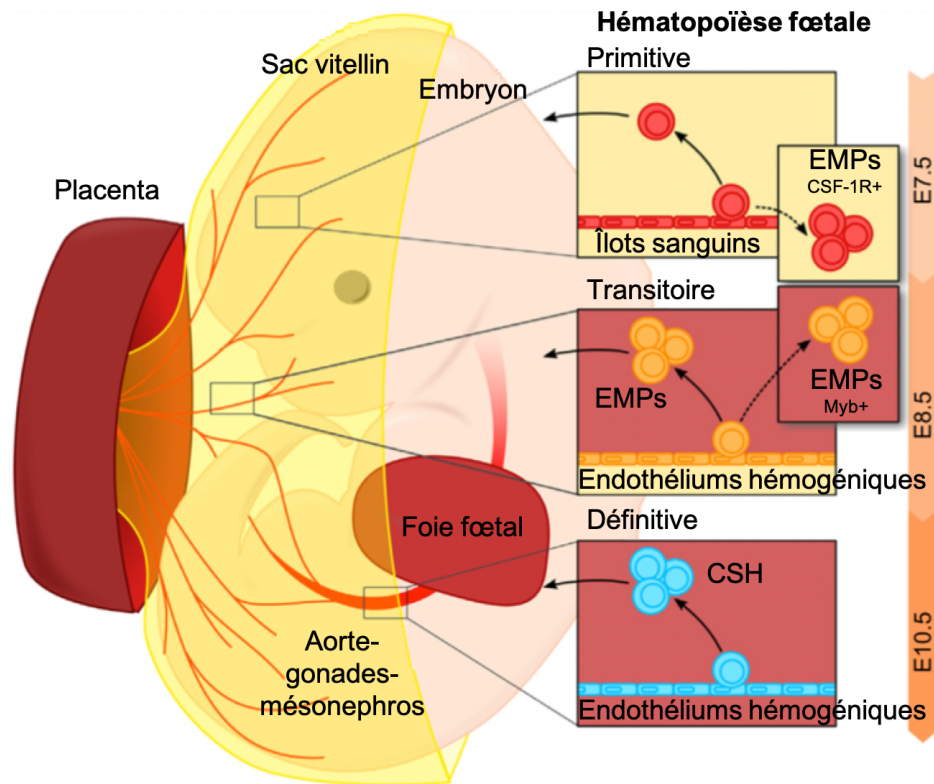


Figure 4. Représentation de l'hématopoïèse embryonnaire.

Chez la souris, l'hématopoïèse embryonnaire se produit en trois vagues successives. La première vague, dite primitive, donne naissance aux progéniteurs érythro-myéloïdes (EMPs) qui peuvent directement générer des macrophages. Au cours de la deuxième vague, dite transitoire, des progéniteurs lympho-myéloïdes émergent. Lors de cette vague, les EMPs migrent vers le foie où ils peuvent donner naissance à des monocytes fœtaux. La troisième et dernière vague, dite définitive, permet de générer des cellules souches hématopoïétiques (CSH) fœtales qui vont coloniser le foie fœtal ainsi que la moelle osseuse fœtale.

Adapté de (Ginhoux and Williams, 2016b)

La deuxième vague d'hématopoïèse s'appelle « l'hématopoïèse transitoire » et se caractérise par l'émergence de progéniteurs lympho-myéloïdes (Li et al., 2014). Cette vague est dite transitoire car elle ne persiste pas lors de transplantation dans des souris immunodéprimées (Hoeffel and Ginhoux, 2015; Hoeffel et al., 2015). A E8,5, la circulation sanguine est établie et les EMPs peuvent alors migrer vers le foie fœtal où ils génèrent notamment des monocytes fœtaux. Simultanément aux EMPs tardifs présents à E8,5, une troisième vague naît de l'endothélium intra-embryonnaire et génère les CSH immatures dans la région du splanchnopleure para-aortique. Cette vague donne naissance à des CSH fœtales dans la région de l'aorte, des gonades et

du mésonéphros (AGM) à E10,5. Ensuite, ces CSH fœtales colonisent à la fois le foie fœtal, où elles établissent une « hématopoïèse définitive » (Hoeffel et al., 2015), et la moelle osseuse fœtale, où elles vont finalement générer des CSH qui persisteront dans la moelle osseuse adulte. A partir de E12,5, le foie fœtal devient le principal organe hématopoïétique de l'embryon.

Bien que l'origine embryonnaire de certains macrophages tissulaires soit aujourd'hui acceptée, l'identité précise des progéniteurs, la voie exacte de différenciation en cellules matures et les facteurs de transcription impliqués sont encore méconnus.

Trois différents modèles ont été proposés pour l'ontogénie des macrophages embryonnaires : (1) les macrophages dérivés du sac vitellin constitueraient les principaux précurseurs de la plupart des macrophages résidents (Gomez Perdiguero et al., 2015), (2) ce sont les « EMPs tardifs » qui seraient les principaux précurseurs de la plupart des macrophages résidents par le biais d'un intermédiaire monocyttaire (Hoeffel et al., 2015), (3) ce sont les CSH fœtales qui seraient les précurseurs prédominants des monocytes du foie fœtal, et les macrophages adultes dériveraient de ces CSH fœtales définitives (Sheng et al., 2015a), à l'exception de la microglie. Aujourd'hui encore ces différentes hypothèses demeurent sujet à débat.

Les macrophages résidents dérivés des monocytes

Comme mentionné ci-dessus, en conditions physiologiques, certaines populations de macrophages résidents se maintiennent par auto-renouvellement avec une contribution minimale des monocytes circulants (Gomez Perdiguero et al., 2015; Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013). C'est le cas de la microglie, des macrophages résidents du foie, de l'épiderme, du poumon, du pancréas et de la pulpe rouge splénique (Bruttger et al., 2015; Calderon et al., 2015; Chorro et al., 2009; Hashimoto et al., 2013). Cependant, dans certains tissus comme l'intestin, le cœur et le péritoine, on distingue plusieurs populations de macrophages en conditions physiologiques à l'état adulte. Alors que certaines sont bien d'origine embryonnaire, d'autres dérivent des monocytes (Bain et al., 2014, 2016; Molawi et al., 2014; Shaw et al., 2018).

Ainsi, dans l'intestin, les monocytes jouent un rôle crucial dans le renouvellement de sous-populations de macrophages résidents (Shaw et al., 2018). Ceci est aussi observé dans le derme (Jenkins et al., 2011), le cœur (Epelman et al., 2014a, 2014b; Molawi et al., 2014) et le péritoine (Bain et al., 2016). Il a été observé que la part de

prolifération *in situ* versus le recrutement de monocytes dérivés de la moelle osseuse pour le maintien du pool de macrophages résidents en condition homéostatique peut varier en fonction du tissu (Italiani and Boraschi, 2017).

En conditions pathologiques, les monocytes peuvent infiltrer un tissu et s'y différencier en macrophages qui acquièrent parfois des caractéristiques similaires aux macrophages résidents du tissu en question. Dans le foie, la nature de la lésion détermine la contribution des macrophages dérivés des monocytes au pool de KCs. Ainsi, une déplétion non physiologique des KCs ou leur mort induite par des agents infectieux conduit au recrutement et à la différenciation de monocytes en KCs (Blériot et al., 2015; Bonnardel et al., 2019; Lai et al., 2018; Scott et al., 2016, 2018). Dans le poumon également, suite à une déplétion des macrophages alvéolaires dans le cadre d'une infection causée par le virus de l'herpès gamma, le pool de macrophages est reconstitué par des macrophages dérivés des monocytes, de manière CCR2 dépendante (Machiels et al., 2017). Dans le péritoine, des macrophages péritonéaux dérivés des monocytes s'installent après un challenge au thioglycollate et se maintiennent dans le temps (Yona et al., 2013).

Des différences existent entre les macrophages résidents d'origine embryonnaire et les macrophages résidents dérivés des monocytes. Néanmoins, une comparaison du transcriptome de ces deux types de macrophages résidents a permis d'établir que plus de 90% des gènes s'expriment de manière similaire dans le poumon, la cavité péritonéale et le foie (Beattie et al., 2016; Gibbings et al., 2015; Lavin et al., 2014; Scott et al., 2016). En revanche, quelques marqueurs phénotypiques ont été identifiés ce qui permet notamment de différencier les deux types de macrophages résidents (Beattie et al., 2016; Gibbings et al., 2015).

Ainsi, les macrophages résidents, qu'ils soient d'origine embryonnaire ou qu'ils soient constamment dérivés des monocytes circulants, présentent une signature génique commune, ce qui montre que l'environnement tissulaire dicte en grande partie la programmation transcriptionnelle des macrophages.

Maintenance des macrophages résidents et capacité proliférative

Les signaux micro-environnementaux régulent étroitement le développement et le maintien des macrophages. Un apport continu de facteurs trophiques tels que l'interleukine-34 (IL-34), le CSF1 (aussi appelé M-CSF) et le CSF2 est nécessaire au

développement et au maintien des macrophages dans les tissus (Huffman et al., 1996; Lavin et al., 2015; Ma et al., 2012; Wang et al., 2012; Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990; Yoshida et al., 2001). CSF1R, le récepteur au CSF1 et à l'IL-34, est ainsi indispensable au développement, à la survie et à la prolifération de la plupart des macrophages résidents. Dans un modèle murin d'inactivation de *Csf1r*, on constate une réduction significative du nombre de macrophages dans de nombreux tissus de l'organisme (Dai et al., 2002; Pridans et al., 2018a). A l'inverse, une injection de CSF1 recombinant induit une prolifération massive mais transitoire de presque tous les macrophages résidents, suivi d'un retour progressif à un nombre homéostatique (Gow et al., 2014; Pridans et al., 2018b). L'ensemble de ces observations indique l'existence de deux seuils différents d'activité du CSF1. Le premier seuil est un seuil de survie qui doit être atteint afin d'assurer la longévité des macrophages. Le second est un seuil de prolifération qui favorise le renouvellement des macrophages. Ainsi, le niveau de production et de consommation des facteurs de croissance contrôlerait la densité locale des macrophages, également appelée niche (Guilliams et al., 2020). Dans le foie, la repopulation du pool de KCs après leur déplétion dépend en partie de la prolifération des KCs embryonnaires restantes. Cette prolifération est transitoire et s'arrête lorsque le pool de KCs est restauré, ce qui suggère que c'est la vacuité de la niche couplée à la présence de facteurs trophiques qui régulent la prolifération des KCs embryonnaires (Scott et al., 2016). D'autres études ont montré que les KCs dérivées des monocytes proliféraient également (Blériot et al., 2015; Bonnardel et al., 2019). Dans ces modèles de déplétion non physiologique des KCs, les KCs d'origine embryonnaire semblent avoir un avantage compétitif sur leurs homologues dérivées des monocytes. En effet, il semblerait que la prolifération des KCs embryonnaires intervienne en amont de celle des KCs dérivées des monocytes (Bonnardel et al., 2019; Scott et al., 2016).

Ainsi le repeuplement du pool de macrophages résidents par des macrophages dérivés des monocytes présenterait des caractéristiques similaires dans tous les tissus. Les macrophages résidents restants prolifèrent et entrent en compétition avec les macrophages dérivés des monocytes recrutés pour les niches disponibles. Dans l'ensemble, cela suggère que la proportion de remplacement des macrophages dépend fortement du degré de déplétion des macrophages résidents et de l'intensité de l'inflammation.

b) Développement des macrophages dérivés des monocytes (MoDMacs)

Lors d'un épisode inflammatoire, un recrutement des monocytes présents dans la circulation vers le tissu affecté s'opère (Mantovani et al., 2004). Ces monocytes vont alors se différencier en macrophages inflammatoires *in situ*. Ces macrophages s'accumulent et deviennent même parfois majoritaires dans le tissu inflammé où ils cohabitent dorénavant avec les macrophages résidents. Comme mentionné plus haut, ces macrophages peuvent parfois adopter des caractéristiques de macrophages résidents lorsque cela est nécessaire. Ces macrophages dérivés des monocytes présentent souvent un phénotype pro-inflammatoire dans les premiers stades de la réponse. Ils sécrètent une variété de médiateurs inflammatoires, notamment le TNF α , l'IL-1 β et le NO, qui permettent d'activer les mécanismes de défense antimicrobienne lorsque que la lésion est due à un pathogène (Murray and Wynn, 2011). Ces macrophages recrutés sont initialement bénéfiques car ils facilitent la clairance des pathogènes et des débris cellulaires. Cependant, ils peuvent aussi engendrer d'importants dommages tissulaires dits collatéraux en raison de l'activité toxique des espèces réactives de l'oxygène et des cytokines qu'ils produisent. Si la réponse inflammatoire n'est pas rapidement contrôlée, celle-ci peut alors devenir chronique et contribuer à l'initiation et la progression de nombreuses maladies (Krausgruber et al., 2011). Afin de limiter les dommages tissulaires, les macrophages recrutés peuvent entrer en apoptose ou évoluer vers un phénotype anti-inflammatoire ou réparateur et ainsi faciliter la résolution de la réponse inflammatoire (Oishi and Manabe, 2018). Lorsque l'inflammation est résolue, ces macrophages inflammatoires dérivés des monocytes disparaissent (Gautier et al., 2013). De par leur caractère transitoire, ils se différencient des macrophages résidents.

1.2.3. Différences entre ResMacs et MoDMacs en contexte inflammatoire

L'existence de ces deux populations de macrophages aux origines diverses soulèvent plusieurs questions quant à leurs caractéristiques respectives. Dans le cerveau, les macrophages dérivés des monocytes sont massivement recrutés lors d'un événement inflammatoire, même s'ils ne contribuent pas à la reconstitution de la microglie une fois

l'homéostasie rétablie (Ajami et al., 2011). A l'heure actuelle, il est difficile de distinguer la microglie résidente des cellules dérivées des monocytes en utilisant les marqueurs connus et les outils actuels (Greter et al., 2015). Il n'en demeure pas moins que la microglie et les macrophages dérivés des monocytes jouent un rôle majeur dans les pathologies cérébrales comme observé dans le modèle murin de la sclérose en plaque (l'EAE) (Shemer et al., 2015; Wlodarczyk et al., 2015). Dans la phase précoce du développement de la pathologie, la microglie a la capacité d'éliminer les débris. Son activation conduit à la sécrétion de nombreuses chimiokines qui joueraient un rôle dans l'induction de l'EAE en recrutant les monocytes de manière massive (Jiang et al., 2014; Yamasaki et al., 2014). Par conséquent, inhiber l'activation de la microglie pourrait contribuer à ralentir la progression de cette pathologie (Shemer et al., 2015). Dans le poumon, la repopulation des macrophages alvéolaires dépend du contexte inflammatoire. Les macrophages alvéolaires semblent avoir une fonction immunosuppressive et jouer un rôle protecteur contre l'hyperréactivité des voies respiratoires (Guilliams et al., 2013). Dans le cas de maladies inflammatoires comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), des monocytes sont recrutés dans le poumon mais leur contribution au pool de macrophage alvéolaire reste à déterminer (Vlahos and Bozinovski, 2014). Dans des modèles d'allergie chez la souris, il a été montré que les macrophages alvéolaires avaient tendance à ralentir l'inflammation pulmonaire, tandis que les monocytes circulants la favorisent (Zasłona et al., 2014).

Concernant le foie, une partie de mes travaux de thèse a consisté en l'étude de la diversité des macrophages hépatiques en conditions physiologiques et pathologiques. Par conséquent, les différences phénotypiques et fonctionnelles qui existent entre les KCs et les macrophages dérivés des monocytes seront détaillées plus tard.

Les macrophages représentent ainsi un composant majeur de la défense immunitaire innée. Afin d'exercer leurs diverses fonctions, ces cellules sont équipées d'un large répertoire de récepteurs leur permettant de reconnaître divers motifs moléculaires exogènes et endogènes. Ces récepteurs, pouvant être localisés à la surface de ces cellules ou dans le cytosol, jouent un rôle majeur dans la défense contre les signaux de dangers extracellulaires et intracellulaires.

Dans la suite de mon manuscrit, je présenterai les récepteurs dont les macrophages disposent pour contrer les attaques étrangères et exercer leurs fonctions essentielles à l'organisme.

II. Les récepteurs de l'immunité innée

Les cellules immunitaires sont équipées de nombreux récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes, favorisant ainsi la détection des pathogènes et le déclenchement d'une réponse immune appropriée. Ces récepteurs, désignés par le terme PRR (Pattern Recognition Receptor), sont capables de reconnaître des structures microbiennes connues sous le nom de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs). Les PAMPs sont des structures moléculaires présentes à la surface des agents pathogènes et certains PAMPs peuvent également être retrouvés à la surface des cellules apoptotiques ou sénescents. Certains PRR reconnaissent également des motifs moléculaires associés au danger, les DAMPs. Il s'agit de signaux endogènes activés lors de lésions tissulaires ou cellulaires. Au sein de la grande famille des récepteurs PRR, on distingue différents sous-ensembles : les récepteurs de type NOD (NLRs), les récepteurs de type RIG-I (RLRs), les récepteurs des lectines de type C (CLR) ainsi que les récepteurs de type Toll (TLRs).

II.1. Les récepteurs de type NOD (NLRs)

Les récepteurs de type NOD (NLRs) sont localisés dans le cytoplasme et exprimés par différents types cellulaires dont les cellules immunitaires. Grâce à leur capacité à reconnaître les PAMPs et les DAMPs cytosoliques, les NLRs sont sensibles aux signaux de stress et d'infection (Fritz et al., 2006; Inohara et al., 2005; Kanneganti et al., 2007; Meylan et al., 2006; Ting et al., 2008). Leur stimulation induit l'activation de la signalisation NF- κ B et conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de molécules antimicrobiennes (Saxena and Yeretssian, 2014). Des mutations génétiques des NLRs ont été associées à des pathologies inflammatoires chroniques ou auto-immunes (Fritz et al., 2006). Notamment, il a été montré que la

maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique des intestins, est associée à des mutations génétiques de NOD2 (Ogura et al., 2001).

Les NLRs les plus étudiés, NOD1 et NOD2, reconnaissent des motifs du peptidoglycane (PGN), un constituant essentiel de la paroi cellulaire bactérienne. NOD1 reconnaît spécifiquement le D- γ -glutamyl-meso-DAP dipeptide (iE-DAP) (Chamaillard et al., 2003) retrouvé dans le PGN de toutes les bactéries à Gram négatives et quelques bactéries à Gram positive. NOD2 est quant à lui capable de reconnaître le muramyl dipeptide (MDP) conservé dans presque toutes les bactéries. Ainsi, NOD2 possède un spectre de détection plus large qui lui permet d'agir comme senseur général, tandis que NOD1 reconnaît de manière plus spécifique certaines sous-populations bactériennes. Une fois que NOD1 et NOD2 ont liés leurs ligands respectifs, ils oligomérisent et activent la kinase RIP2 qui médie l'ubiquitination de NEMO/IKK γ conduisant à l'activation de NF- κ B et à la production de cytokines inflammatoires (Kobayashi et al., 2002). Les NLRs jouent donc un rôle essentiel au sein du système immunitaire innée puisqu'ils constituent une ligne de défense contre les signaux de dangers intracellulaires.

11.2. Les récepteurs de type RIG 1 (RLRs)

Les récepteurs de type RIG-I (RLRs) constituent une famille d'ARN hélicases cytoplasmiques jouant un rôle clé dans la réponse antivirale de l'organisme. Au sein de cette famille on distingue 3 membres : RIG1 (retinoic-acid-inducible protein 1), MDA5 (melanoma-differentiation-associated gene 5) et LGP2 (laboratory of genetics and physiology 2). Ces récepteurs présentent tous un domaine hélicase en C-terminal leur permettant de détecter les ARNs viraux intracytoplasmiques (Beutler et al., 2007; Medzhitov, 2007). Afin que RIG1 puisse reconnaître un ARN viral, il faut que celui-ci présente des caractéristiques permettant de le différencier des ARNs de l'hôte (Gebhardt et al., 2017). Ainsi, RIG1 détecte les ARN viraux sans extrémité 5'-di/triphosphate et présentant une extrémité brisée et double brin à l'extrémité triphosphate (Rehwinkel and Gack, 2020). Une autre caractéristique de reconnaissance des ARNs double brins est leur longueur. Il a été établi que RIG1 détecte préférentiellement les ARNs double brins courts alors que MDA5 reconnaît lui les ARNs double brins longs (Kato et al., 2008). L'ARN double brin viral est également

reconnu par le récepteur TLR3 exprimé à la surface des membranes cellulaires et des endosomes. La reconnaissance des ARN doubles brins par RIG-I/ MDA-5 ou TLR3 dépend du type cellulaire en question (Kato et al., 2005; Slater et al., 2010). Ainsi, suite à une infection virale, les récepteurs RIG-I et MDA-5 ont la capacité de détecter l'ARN double brin et d'induire la production d'interféron de type I (IFN- α et IFN- β) et de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées (Yoneyama et al., 2015). Les récepteurs RLRs participent ainsi à la défense contre les virus.

11.3. Les récepteurs des lectines de type C (CLRs)

Les récepteurs CLRs forment une grande famille de récepteurs transmembranaires caractérisés par la présence d'un domaine de liaison aux carbohydrates (C-type domain). Les CLRs peuvent donc reconnaître les épitopes carbohydratés des micro-organismes tels que les virus, les bactéries et les champignons (Kawai and Akira, 2011). On peut distinguer différentes catégories de CLRs. Les CLRs de type I (DEC-205, MRC1) et II (Dectin-1 et -2, Mincle, DNGR-1) qui sont capables de se lier à la membrane et possèdent plusieurs ou un unique domaine de reconnaissance des carbohydrates, respectivement. Le dernier type de CLR est constitué des CLR solubles tel que le récepteur MBL qui est une protéine capable de lier un large spectre de fragments carbohydratés présents à la surface des pathogènes. Les CLRs sont exprimés par la majorité des types cellulaires, dont les macrophages, et sont non seulement capables de reconnaître certains fragments de pathogènes pour la défense de l'hôte, mais aussi certains antigènes du soi modifiés comme les DAMPs relargués par les cellules mortes (Sancho and Reis e Sousa, 2013). Une fois activés, les récepteurs CLRs peuvent stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires afin de moduler l'amplitude, la durée et la résolution de la réponse immunitaire (del Fresno et al., 2018).

11.4. Les récepteurs de type Toll (TLRs)

Les récepteurs TLRs jouent un rôle crucial dans la défense primaire de l'hôte suite à l'invasion d'un organisme pathogène mais ils répondent également à des signaux de danger endogènes. Ils déclenchent une réponse rapide et permettent d'orienter la

cellule activée vers une réponse immunitaire adaptée (Yu and Feng, 2018). Ces récepteurs sont exprimés dans tous les tissus et par tout type de cellule susceptible d'exercer une réponse immunitaire innée tels que les cellules du système immunitaire innée (macrophages, monocytes, cellules NK, neutrophiles et cellules dendritiques), les cellules du système immunitaire adaptatif (cellules dendritiques, lymphocytes T et B) mais aussi par des cellules non-immunitaires (cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibroblastes) (Delneste et al., 2007; Zarembler and Godowski, 2002). Une fois activés, les TLRs sont ainsi capables d'initier l'induction de la réponse inflammatoire innée et adaptative (Blander and Medzhitov, 2006).

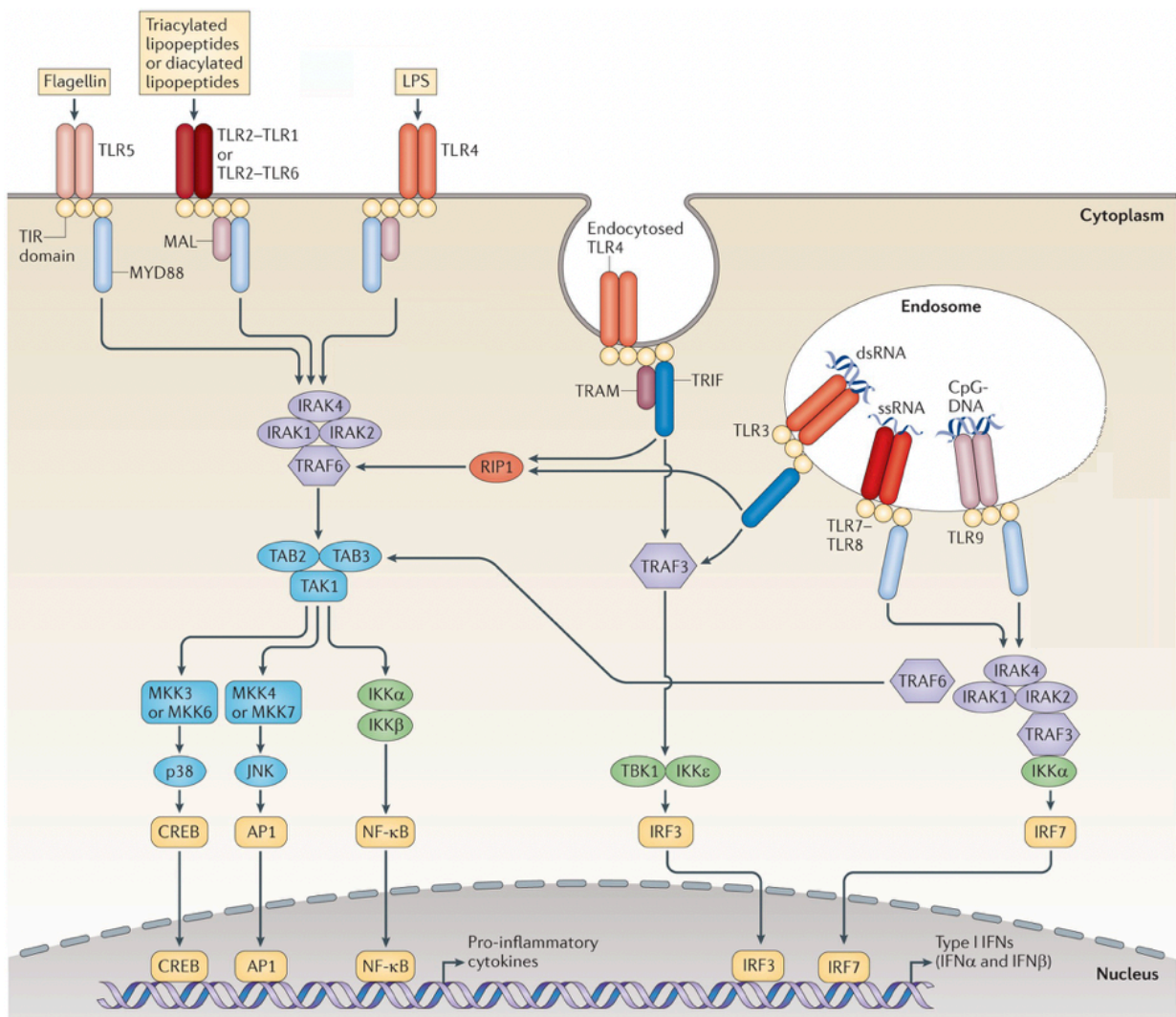


Figure 5. Voies de signalisations activées par les TLRs.

Les TLRs peuvent être membranaires (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) ou intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9). Une fois activé par leur ligand respectif, les TLRs activent diverses voies de signalisations telles que la voie NF-κB et la voie des MAPKs qui aboutissent à la production de cytokines pro-inflammatoires ou d'interférons de type I.

11.4.1. Structure et principes généraux de signalisation

Les récepteurs TLRs sont des protéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire riche en leucines (LRR, leucine rich repeat) qui permet la reconnaissance des ligands. Ils sont aussi constitués d'un domaine transmembranaire ainsi que d'un domaine intracellulaire TIR (Toll / IL-1 receptor). Ce dernier est hautement conservé et a pour rôle de conduire le signal grâce à son interaction avec différentes protéines adaptatrices intracellulaires. Une fois stimulé par son ligand, le TLR active de manière spécifique une cascade de signalisation intracellulaire, ce qui constitue l'initiation de la réponse de l'hôte contre l'agent reconnu (Wang et al., 2016). Cette signalisation dépend de la nature du stimulus, du TLR activé mais aussi de la molécule adaptatrice recrutée. On distingue deux voies de signalisation en fonction de la molécule adaptatrice recrutée : la voie impliquant la protéine MyD88 et la voie impliquant la protéine TRIF (Kagan, 2012). MyD88 est utilisé par presque tous les TLRs et conduit à la production de cytokines inflammatoires en activant la voie NF- κ B et celle des MAP kinases (MAPKs). TRIF est un adaptateur de TLR3 et TLR4 et il stimule une voie indépendante de MyD88 qui aboutit à la production d'IFN de type I et de cytokines inflammatoires via l'activation d'IRF3, NF- κ B et des MAPKs. Un défaut au sein de ces voies de signalisation peut impacter le développement et la progression de diverses pathologies telles que les maladies auto immunes, les pathologies inflammatoires chroniques, les maladies infectieuses ou encore le cancer (Huang and Pope, 2009).

11.4.2. TLR membranaires et TLR intracellulaires

Chaque TLR est spécifique d'un répertoire de ligands donné. En fonction de leur localisation, on distingue deux catégories de TLRs : ceux qui sont présents à la membrane des cellules et ceux à localisation intracellulaire. Les TLRs localisés à la surface des cellules sont les suivants : TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6. Ils sont capables de détecter des composants membranaires des pathogènes comme les lipides, les protéines et les lipoprotéines. TLR2, couplé à TLR1 ou TLR6, reconnaît ainsi une vaste gamme de PAMPs dont les lipoprotéines, les peptidoglycans et les

acides lipotéichoïques (LTA) (Kawai and Akira, 2010). TLR4 reconnaît les lipopolysaccharides bactériens (LPS) et TLR5 reconnaît quant à lui la flagelline bactérienne (Akira et al., 2006). Les TLRs localisés dans les compartiments intracellulaires tels que l'endosome vont plutôt détecter les acides nucléiques dérivés des bactéries et des virus mais aussi les acides nucléiques du soi dans le cas des pathologies auto-immunes (Blasius and Beutler, 2010). Parmi ces TLRs intracellulaires, on retrouve TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9. TLR3 reconnaît l'ARN viral double brin, les petits ARNs interférents ainsi que les ARNs du soi dérivés des cellules endommagées (Bernard et al., 2012; Takemura et al., 2014). TLR7 reconnaît l'ARN simple brin d'origine virale alors que TLR8 détecte aussi bien l'ARN viral que bactérien (Guiducci et al., 2013). TLR9 reconnaît quant à lui l'ADN viral et bactérien riche en répétitions de dinucléotides CpG non méthylés. La spécificité de localisation des TLRs permet de réguler la reconnaissance des ligands ainsi que la signalisation qui en résulte.

11.4.3. Le récepteur TLR4

a) Description et expression de TLR4

TLR4 est le mieux caractérisé de tous les PRRs. Il s'agit d'une protéine transmembranaire possédant un domaine extracellulaire, ou ectodomaine, composé de 22 répétitions riches en leucine. Une hélice transmembranaire de 21 acides aminés relie l'ectodomaine de TLR4 à l'endodomaine constitué d'environ 200 acides aminés. Cet endodomaine contient un domaine TIR essentiel pour la transduction du signal. TLR4 a été décrit comme présentant une grande variété de fonctions dans divers contextes pathologiques tels que les troubles auto-immuns, les maladies inflammatoires de l'intestin, les pathologies métaboliques associées à l'obésité ou les maladies cardiovasculaires.

Ce récepteur est exprimé par les cellules de la lignée myéloïde ainsi que dans de nombreux types cellulaires non immunitaires telles que les cellules endothéliales ou épithéliales.

b) Ligands de TLR4

TLR4 agit comme un récepteur spécifique du lipopolysaccharide (LPS) issu des bactéries Gram négatives. Le récepteur TLR4 peut aussi se lier à certains DAMPs tels que l'acide hyaluronique, la fetuine A, HMGB1 (High-mobility group box-1) et les protéines de choc thermique hsp60 et hsp70 (Habich et al., 2002; Lin et al., 2011; Makkar et al., 2019; Pal et al., 2012). D'autre part, il a longtemps été admis au sein de la communauté scientifique que les acides gras, et notamment le palmitate, constituaient des agonistes du récepteur TLR4. En effet, les premières preuves du lien entre TLR4 et l'inflammation induite par les lipides sont même antérieures à son identification en tant que récepteur des LPS (Liao et al., 1993). Or, Lancaster et al ont montré récemment que le palmitate n'était pas un ligand de TLR4 car il n'induit pas la dimérisation ni l'endocytose de TLR4 communément observés suite à son activation (Lancaster et al., 2018). Ainsi, TLR4 est capable de reconnaître de nombreux signaux différents, néanmoins le LPS reste le ligand le plus établi. Le LPS représente l'un des composants bactériens aux propriétés immuno-stimulatrices les plus étudiés. Le LPS est un composant structurel important de la membrane externe des bactéries Gram négatives et il est constitué de trois parties : un lipide A, un corps d'oligosaccharide et une chaîne latérale O. La portion contenant le lipide A constitue le principal PAMP du LPS. D'une bactérie à l'autre, la structure du LPS peut varier ce qui influe sur son action. En effet, une récente étude a montré qu'en fonction du type de bactérie et du LPS qui lui est associé l'endotoxémie métabolique pouvait être bénéfique ou délétère (Anhê et al., 2021) Les LPS présentent des caractéristiques distinctes qui vont leur permettre d'avoir un effet sur la perméabilité intestinale, l'absorption intestinale du glucose, la glycémie, l'insuline et sur d'autres paramètres métaboliques. Par exemple, le LPS d'*E.coli* a un impact délétère sur ces paramètres métaboliques. A l'inverse, le LPS de *R. sphaeroides* a un effet bénéfique (Anhê et al., 2021). Néanmoins, le LPS d'*E.coli* demeure très largement le plus couramment utilisé au sein de la communauté scientifique.

c) Reconnaissance des pathogènes et activation de TLR4

La liaison du ligand à son récepteur entraîne l'homodimérisation de TLR4 et l'activation des domaines intracytosoliques des deux chaînes du récepteur qui vont alors pouvoir recruter des protéines de signalisation intracellulaire. Dans le cas d'une réponse au

LPS, plusieurs protéines sont nécessaires afin d'induire une cascade de signalisation. En effet, la stimulation du LPS nécessite l'intervention de la protéine LBP (LPS binding protein), du corécepteur CD14 ainsi que du facteur MD-2 (myeloid differentiation factor 2). La protéine soluble LBP va se lier au LPS ce qui va faciliter l'interaction entre le LPS et le corécepteur CD14. Ce corécepteur CD14 est associé au complexe de reconnaissance du LPS, il permet le transfert du LPS vers le complexe formé par TLR4 et MD-2. MD-2 interagit physiquement avec TLR4 et lui permet de se lier au LPS grâce à sa poche hydrophobe. Le LPS se lie alors simultanément à MD-2 et TLR4, facilitant la formation d'un complexe de dimères TLR4 / MD-2 et permettant le recrutement de deux paires de protéines adaptatrices, TIRAP/Myd88 et TRAM/TRIF, au domaine TIR du récepteur TLR4 (Kawasaki and Kawai, 2014).

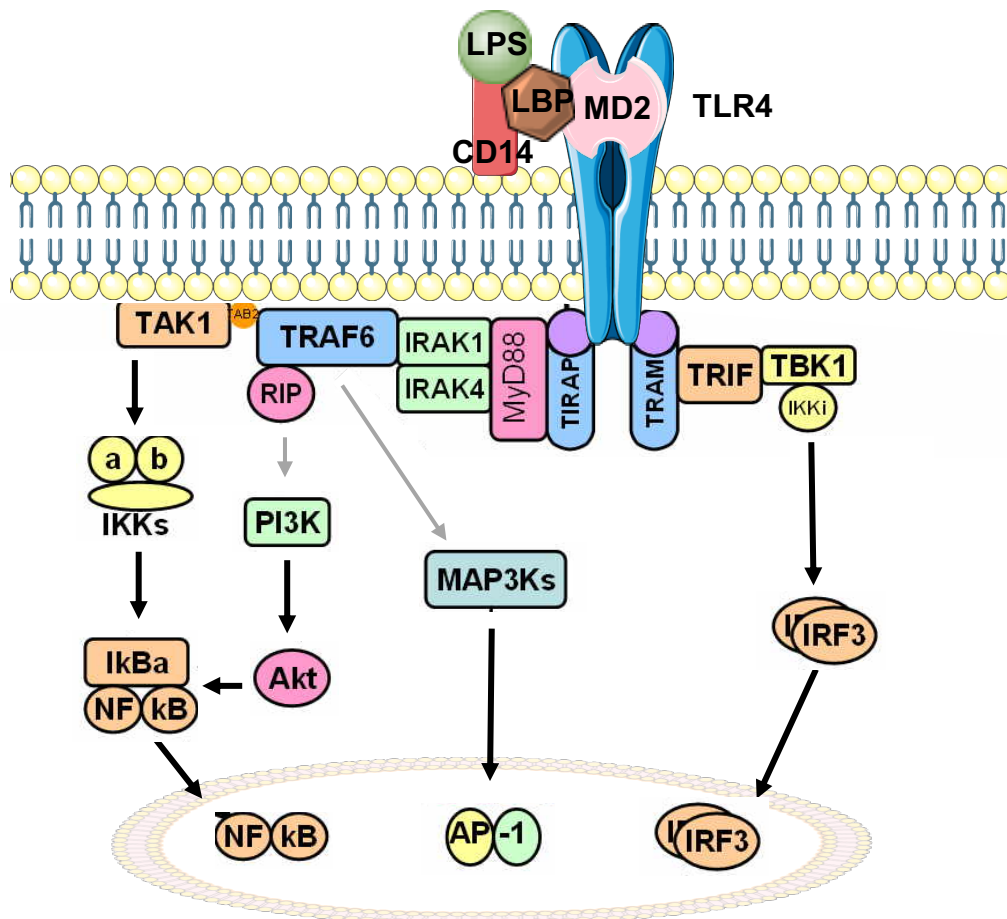


Figure 6. Les différentes voies de signalisation du récepteur TLR4.

Le récepteur TLR4 est capable de reconnaître le LPS et de s'homodimériser afin d'induire le recrutement de deux paires de protéines adaptatrices : TIRAP/Myd88 et TRAM/TRIF. Ainsi le récepteur TLR4 peut induire l'activation de deux voies de signalisation distinctes : la voie Myd88 et la voie TRIF.

d) Signalisation de TLR4

La voie dépendante de MyD88

Une des voies qui peut être induite suite à l'activation de TLR4 est la voie dépendante de la protéine MyD88. L'adaptateur MyD88 est constitué d'un domaine TIR et d'un domaine DD (death domain). C'est grâce à ce dernier que la protéine MyD88 va recruter d'autres molécules impliquées dans la cascade de signalisation. Suite à l'activation du TLR, la protéine MyD88 forme un complexe avec des membres de la famille des kinases IRAK afin de former le myddosome (Lin et al., 2010). Pendant la formation de ce complexe, IRAK4 va activer IRAK1 qui va alors s'auto-phosphoryler sur plusieurs sites puis se dissocier de MyD88 (Kollewe et al., 2004). IRAK1 va ensuite s'associer à TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6) qui va indirectement activer TAK1 (Chen, 2012). Une fois activé, TAK1 déclenche deux voies de signalisation différentes : la voie NF- κ B liée au complexe IKK d'une part, et la voie des MAPKs d'autre part. L'activation de la voie NF- κ B conduit à l'expression de gènes pro-inflammatoires tandis que l'activation de la voie des MAPKs médie notamment l'induction des facteurs de transcription de la famille AP-1 ou la stabilisation de l'ARNm afin de réguler les réponses inflammatoires (Akira et al., 2006).

La voie dépendante de TRIF

Une étude a mis en évidence que les souris déficientes pour MyD88 ne produisaient pas de TNF ou d'IL-6 en réponse à une exposition à des composants microbiens reconnus par les récepteurs TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 et TLR9 (Adachi et al., 1998). La protéine MyD88 joue donc un rôle essentiel dans la réponse à un large spectre de produits microbiens. Cependant, on observe une activation de NF- κ B, bien que plus tardive, chez des macrophages déficients pour MyD88 stimulés au LPS. Cette réponse dépend de la voie TRIF capable d'activer les voies NF- κ B et MAPKs et ainsi d'induire la production de cytokines, de chimiokines inflammatoires et d'interféron de type 1. Seul le récepteur TLR4 est capable d'activer aussi bien la signalisation dépendante de la protéine MyD88 que de TRIF. L'ensemble des autres TLRs est seulement capable d'activer la voie dépendante de MyD88 à l'exception du récepteur TLR3 qui n'a recours qu'à la voie dépendante de TRIF. La différence entre TLR3 et TLR4 dans l'activation de cette voie indépendante de MyD88 se situe dans le recrutement de la protéine

TRIF. En effet, TLR3 est capable de recruter directement TRIF tandis que TLR4 requiert la présence d'un intermédiaire.

En résumé, les macrophages sont équipés avec un arsenal de récepteurs leur permettant de reconnaître une grande diversité d'agents infectieux et de signaux de danger afin d'initier une réponse inflammatoire.

Partie 2 – Rôles des macrophages dans les pathologies hépatiques

Dans le cadre de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux macrophages résidents du foie. Cet organe assure de nombreuses fonctions essentielles. Il interagit notamment avec les systèmes endocrinien et gastro-intestinal en contribuant à la digestion et au métabolisme. Le foie est aussi le lieu de stockage des vitamines liposolubles et participe à l'homéostasie du cholestérol. Il joue également un rôle dans l'hémostase en produisant des facteurs de coagulation et de nombreuses protéines. Il constitue d'autre part la première ligne de défense contre les organismes pathogènes présents dans le sang. Ainsi, le foie assure de nombreuses fonctions vitales et une dérégulation de ces fonctions peut être à l'origine d'une pathologie. Par ailleurs, cet organe étant étroitement lié à l'intestin, il est particulièrement sensible au stimuli pouvant se trouver dans la circulation portale. Parmi les cellules hépatiques pouvant répondre activement à ces stimuli l'on compte les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie.

I. Le foie

1.1. Organisation structurelle

Le foie est constitué de plusieurs lobes inégaux. Chez l'homme, on en distingue quatre dont deux majeurs : le lobe hépatique droit, le plus volumineux, et le lobe hépatique gauche. Entre ces deux lobes majeurs, on distingue le lobe carré et le lobe caudé, qui sont séparés par un sillon appelé le hile du foie. C'est au niveau du hile hépatique que

la veine porte et l'artère hépatique pénètrent dans le foie et que passent les canaux biliaires majeurs. Le foie est entouré d'une gaine conjonctive, la capsule de Glisson. Cette capsule fibreuse possède une multitude de prolongements et divise le foie en une multitude de lobules qui constituent la structure fonctionnelle du foie. Chaque lobule est constitué d'une veine centro-lobulaire en son centre et de plusieurs triades portales en périphérie. Une triade portale regroupe une veine porte, une artère hépatique ainsi qu'un canal biliaire. Le lobule hépatique est structuré par des hépatocytes qui s'organisent en travées autour desquelles va circuler le sang provenant de la veine porte et de l'artère hépatique. Le foie bénéficie ainsi d'une double vascularisation. La circulation portale, qui contribue à hauteur de 70% du sang arrivant dans le foie, drainent des éléments issus directement du tractus gastro-intestinal et est ainsi particulièrement riche en nutriments mais aussi parfois en endotoxines (Malarkey et al., 2005). Les 30% restants sont apportés par l'artère hépatique qui amène au foie un sang provenant du cœur et qui est riche en oxygène (Malarkey et al., 2005). Après des échanges avec les cellules hépatiques, le sang circule de l'artère hépatique et de la veine porte vers la veine centro-lobulaire, qui rejoint ensuite la veine cave inférieure par les veines sus-hépatiques. Le flux biliaire est quant à lui opposé au flux sanguin. La bile est générée au sein des hépatocytes, puis est recueillie dans les canaux biliaires intra-hépatiques. L'ensemble de ces canaux vont se rejoindre pour former un seul canal hépatique commun dit extra-hépatique. Ce canal hépatique commun rejoint ensuite le canal cystique au niveau du hile pour former le canal cholédoque. Grâce à ce canal, la bile se déverse dans le duodénum où elle pourra exercer ses fonctions digestives (Dadoune et al., 2000).

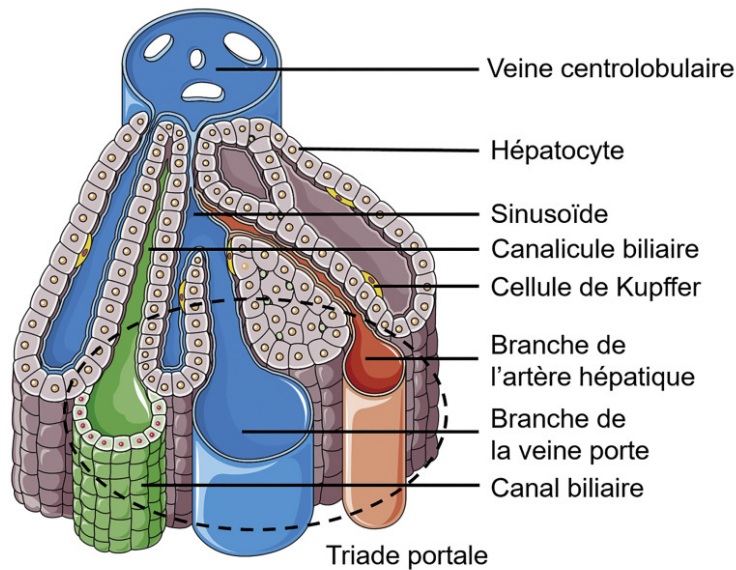


Figure 7. Représentation schématique d'un lobule hépatique.

Le lobule hépatique constitue l'unité structurelle du foie. Il se compose d'une veine centro-lobulaire à son centre et de triade portale en périphérie. Chaque triade portale est constituée d'une veine porte, d'une artère hépatique et d'un canal biliaire. Les hépatocytes structurent le lobule hépatique en s'organisant en travées autour desquelles va circuler le sang provenant de la veine porte et de l'artère hépatique.

Adapté de (Bessaguet and Desmoulière, 2021)

1.2. Fonctions hépatiques

1.2.1. Fonction de détoxification et d'épuration

Le foie représente l'un des principaux organes de détoxification. Cette fonction est assurée par les lobules hépatiques qui constituent une structure filtrante du sang et permet notamment la destruction de toxines, de médicaments et également de nombreuses hormones comme l'insuline. Le foie joue également un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques en les transformant. Cette biotransformation a lieu dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes et permet de transformer des substances lipophiles en substances hydrophiles, afin de favoriser leur élimination. Classiquement, ce processus de transformation est divisé en trois grandes phases : la phase I permet l'hydroxylation du composé à éliminer, la phase II la conjugaison de ce dernier avec une protéine. Ces deux étapes permettent de transformer le composé souvent très hydrophobe en une molécule hydrosoluble plus facile à éliminer. La phase

III consiste en l'excrétion active de ce dernier, à l'aide de transporteurs transmembranaires, soit dans le flux sanguin afin d'être éliminé au niveau rénal, soit dans la bile afin d'être éliminé via les fèces, après sécrétion de la bile au niveau de l'intestin (Modica et al., 2009; Sendensky and Dufour, 2011).

1.2.2. Fonction immunitaire

Le foie est idéalement placé pour détecter les agents pathogènes qui pénètrent dans l'organisme par l'intestin ou qui circulent dans le sang. Comme deux tiers de l'afflux sanguin hépatique provient de la veine porte, et est donc enrichi en éléments issus de l'intestin, le foie est un organe clé pour détecter, capturer et éliminer les endotoxines, les bactéries ou les virus provenant du tractus intestinal. Le foie contient ainsi d'abondantes populations de cellules immunitaires innées comme les cellules de Kupffer ou les lymphocytes NK (Natural Killer) et il constitue donc une des premières lignes de défense immunitaire, après l'intestin, contre les pathogènes et les endotoxines. Par ailleurs, comme le sang portal transporte un grand nombre de molécules étrangères mais inoffensives tels que les antigènes alimentaires, le foie doit également mettre en place un seuil de tolérance contre ces molécules. (Sendensky and Dufour, 2011; Tso and McGill, 2003). Ainsi, il existe un équilibre entre immunité et tolérance qui est essentiel à la fonction hépatique pour maintenir un état immunotolérant. Toutefois, le foie est capable d'organiser une réponse immunitaire rapide et robuste lorsque cela est nécessaire (Kubes and Jenne, 2018).

1.2.3. Fonctions de stockage et de production

Le foie est le lieu de stockage de nombreux composés tels que les vitamines liposolubles et le fer. Il joue également un rôle majeur dans le maintien de la glycémie par sa capacité à stocker le glucose sous forme de glycogène ainsi qu'à métaboliser les glucides via la néoglucogenèse, la glycogénogénèse et la glycogénolyse. Les composés stockés par le foie peuvent ensuite être libérés dans la circulation selon les besoins de l'organisme. Le foie est également un organe où a lieu la synthèse d'un grand nombre de protéines utiles à l'ensemble de l'organisme. Ainsi, de nombreuses protéines circulant dans le sang sont produites et sécrétées par le foie. Il s'agit notamment de protéines « cargos » plasmatiques telles que l'albumine, la transferrine

ou les apolipoprotéines mais aussi de protéines aux fonctions immunitaires telles que le complément ou les facteurs de coagulation (Sendensky and Dufour, 2011). De plus, le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme des stéroïdes et des acides gras via la synthèse et la dégradation du cholestérol, la lipogenèse *de novo* ainsi que la synthèse des triglycérides. Ainsi, du fait de ses capacités de stockage et de synthèse, le foie participe à un grand nombre de fonctions biologiques et notamment à la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme en adaptant son action selon le statut nutritionnel.

1.3. Types cellulaires présents dans le foie

Le foie est constitué de différents types cellulaires. Les hépatocytes sont le type cellulaire majoritaire et représentent environ deux tiers des cellules hépatiques. On retrouve également les cellules endothéliales sinusoidales, les cellules étoilées, les cholangiocytes, ainsi que les cellules de Kupffer (Racanelli and Rehermann, 2006). Les hépatocytes, organisés en travées au sein des lobules, possèdent des fonctions spécialisées, notamment métaboliques, en fonction de leur localisation. Les hépatocytes sont polarisés : ils possèdent une face apicale canaliculaire par laquelle la bile est sécrétée et une face basolatérale sinusoidale. Une fois sécrétée dans les canalicules, la bile est en contact direct avec les cholangiocytes, des cellules épithéliales jouant un rôle particulièrement important dans la modification de la bile sécrétée par les hépatocytes. Les cholangiocytes forment également une barrière contre les éventuels microorganismes et autres molécules nocives présentes dans la bile grâce à leurs jonctions serrées. Ce rôle de barrière protectrice est aussi joué par les travées hépatocytaires qui sont bordées par les sinusoides hépatiques dont les parois sont tapissées de cellules endothéliales sinusoidales (LSECs). Les LSECs ne forment pas seulement une barrière entre la circulation sanguine et le parenchyme, elles jouent aussi des rôles physiologiques importants. Elles assurent ainsi l'élimination par endocytose des pathogènes rencontrés. Elles ont également des fonctions immunologiques innées et adaptatives, notamment la présentation d'antigènes et le maintien de l'équilibre entre la tolérance et les réponses immunitaires effectrices (Shetty et al., 2018). Enfin, elles permettent le passage de substances présentes dans la circulation sanguine tels que les nutriments essentiels. Dans des conditions inflammatoires, elles peuvent aussi influencer la composition des

populations immunitaires hépatiques en médiant la diapédèse de cellules via la sécrétion de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion (Shetty et al., 2018).

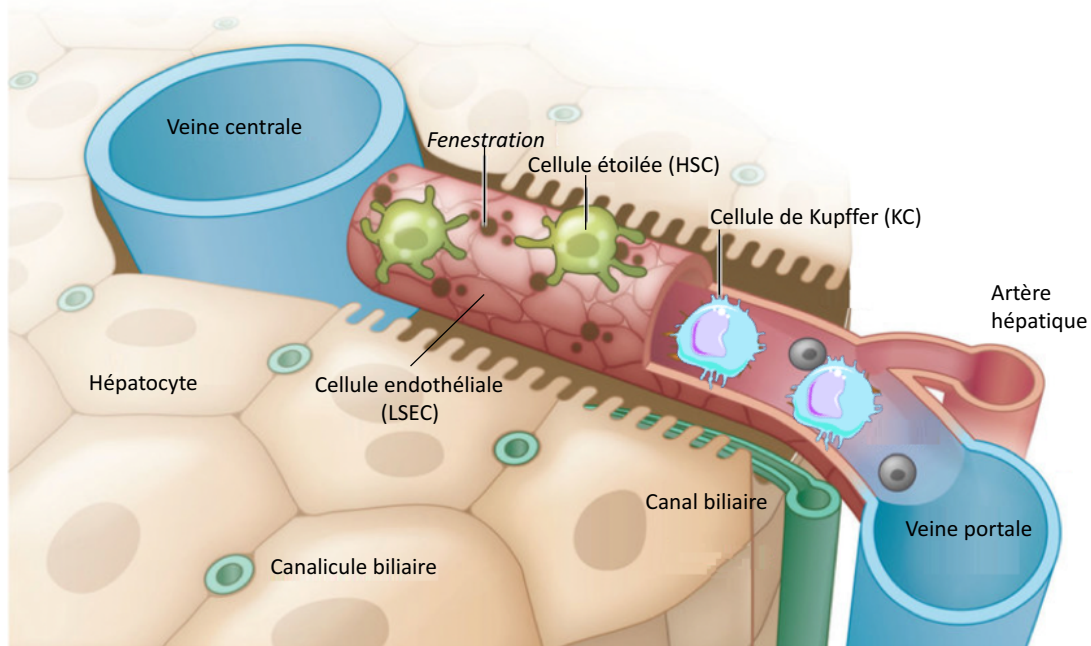


Figure 8. Représentation schématique d'un sinusoiide hépatique.

Différents types cellulaires constituent le foie. Les hépatocytes sont les principales cellules de cet organe qui est également composé de cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins, de cellules de Kupffer localisées dans les sinusoiides hépatiques, de cellules étoilées ou de cholangiocytes formant les canaux biliaires. Chacun de ces types cellulaires assurent des fonctions précises dans le foie afin de maintenir l'homéostasie tissulaire.

Adapté de (Ehrlich et al., 2019)

Les LSECs interagissent avec différents types cellulaires tels que les cellules de Kupffer ou encore les cellules étoilées du foie. Les cellules étoilées, localisées dans l'espace de Disse, représentent une population de cellules qui à l'état quiescent stockent la vitamine A et qui en conditions pathologiques peuvent proliférer, synthétiser des éléments de la matrice extracellulaire et ainsi participer à la mise en place d'une fibrose hépatique. Les cellules étoilées peuvent elles aussi interagir avec les cellules de Kupffer, et nous nous intéresserons plus particulièrement à ces dernières ci-dessous.

1.4. Les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie

Le foie héberge une population de macrophages résidents appelés cellules de Kupffer (KCs). Ces cellules d'origine embryonnaire sont localisées au sein des sinusoides hépatiques en contact avec les LSECs et sont donc idéalement positionnées pour interagir avec les éléments du sang arrivant par la veine porte ou la veine centrale. De nombreuses études attribuent un rôle central des KCs dans l'inflammation, notamment dans le développement de pathologies hépatiques telles que l'hépatite virale, les carcinomes hépatocellulaires, la cirrhose alcoolique ou la stéatohépatite non-alcoolique.

1.4.1. Ontogénie

Comme une majorité de macrophages résidents, les KCs s'établissent tôt lors du développement à partir de progéniteurs embryonnaires. Cependant, les avis divergent au sein de la communauté scientifique quant à leur origine précise. D'une part, il a été proposé que les monocytes du foie fœtal issus des cellules souches hématopoïétiques pouvaient se différencier en macrophages résidents, parmi lesquels, les KCs (Sheng et al., 2015b). Par ailleurs, d'autres groupes suggèrent que les progéniteurs érythromyéloïdes dérivés du sac vitellin peuvent non seulement se différencier en monocytes du foie fœtal (Hoeffel and Ginhoux, 2015) mais également donner directement naissance à un pré-macrophage, tous deux précurseurs des macrophages résidents dont les KCs (Kim et al., 2016). L'origine des KCs est donc bien embryonnaire mais leur(s) précurseur(s) exact(s) restent encore sujet à débat.

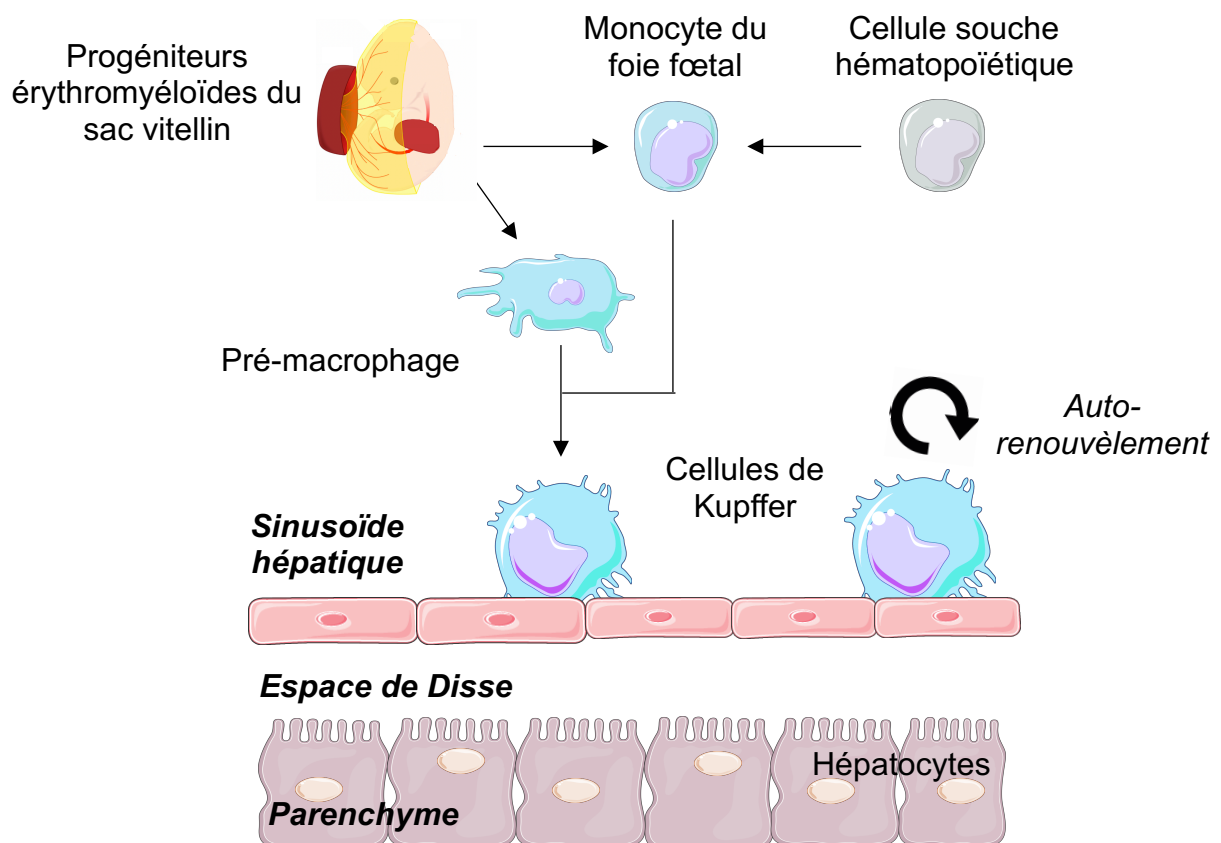


Figure 9. Modèle actuel du développement des KCs.

Les KCs sont localisées dans les sinusoides hépatiques. Plusieurs origines leur sont attribuées. Ces cellules peuvent dériver de progéniteurs érythromyéloïdes du sac vitellin différenciés en pré-macrophage et/ou se différencier à partir de monocytes du foie foetal. Ces monocytes seraient issus des progéniteurs érythromyéloïdes du sac vitellin et/ou des cellules souches hématopoïétiques. L'origine exacte des KCs reste ainsi controversée. Une fois établies, les KCs se maintiennent par prolifération locale indépendamment des monocytes circulants.

Une fois établies chez l'adulte, les KCs se maintiennent par prolifération locale en conditions d'homéostasie et ce indépendamment des monocytes circulants (Hashimoto et al., 2013). Ainsi, dans le foie, la niche de macrophages demeure peuplée au cours de la vie par des KCs d'origine embryonnaire (EmKCs) grâce à leur capacité d'auto-renouveaulement (Soucie et al., 2016). Les signaux spécifiques conduisant à la différenciation des KCs proviennent des LSECs et des HSCs. Il a ainsi été montré que la production du ligand de Notch DLL4 par ces cellules était essentielle pour activer le facteur LXR α qui détermine l'identité des KCs et leur survie (Bonnardel et al., 2019; Scott et al., 2018).

Dans des conditions inflammatoires ou dans un contexte de déplétion non physiologique des EmKCs, les monocytes circulants peuvent se différencier en KCs et ainsi participer au pool de KCs (Blériot et al., 2015; Scott et al., 2016). Les KCs sont donc des macrophages résidents d'origine embryonnaire qui se maintiennent par prolifération locale. Suite à leur déplétion, elles peuvent être remplacées par des KCs d'origine monocyttaire.

1.4.2. Fonctions des KCs

Même si l'implication des KCs dans de nombreuses pathologies a été suggérée, leurs modes d'action précis demeurent largement méconnus. Jusqu'à récemment, la majorité des études s'intéressant à la fonction des KCs ont été réalisées via des approches de déplétion qui ne sont pas spécifique des KCs. Les chercheurs ont souvent eu recours à l'utilisation de liposomes contenant du clodronate, une molécule pro-apoptotique, afin d'étudier le rôle des KCs. Ces liposomes sont phagocytés par les macrophages ce qui induit leur mort par apoptose. Cependant, les effets des liposomes contenant du clodronate ne sont pas spécifique d'un tissu ou d'un type cellulaire donné. En effet, sont ciblés par cette approche les monocytes circulants, les cellules dendritiques ainsi que les macrophages de nombreux tissus (foie, rate, moelle osseuse, ...) (Moreno, 2018). Par conséquent, parmi les fonctions qui ont pu être attribuées aux KCs, certaines restent à être formellement établies tandis que d'autres sont aujourd'hui reconnues et acceptées au sein de la communauté scientifique.

Les KCs jouent potentiellement un rôle dans le métabolisme intravasculaire des lipides, notamment le cholestérol. En effet, chez l'homme, elles représentent la source majeure de CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein), une protéine plasmatique impliquée dans la régulation des concentrations circulantes de HDL (High Density Lipoprotein) et des VLDL (Very Low Density Lipoprotein), les lipoprotéines de haute et très faible densité (Wang et al., 2015). La CETP permet de stimuler le transfert d'ester de cholestérol et de triglycérides entre les VLDL et les HDL afin que ces derniers les acheminent au foie pour élimination.

Un autre rôle des KCs consiste à éliminer les globules rouges sénescents via l'érythrophagocytose. Les KCs assurent la clairance des érythrocytes stressés ou sénescents via leurs récepteurs de surface MARCO, CD36 et SR-A1 (Theurl et al., 2016, 2008; Willekens et al., 2005). Toutefois, l'absorption excessive de globules

rouges stressés pourrait entraîner la mort des KCs embryonnaires (Theurl et al., 2016). Suite à la phagocytose des érythrocytes, les KCs assurent le recyclage du fer et expriment l'ensemble des gènes impliqués dans l'absorption, la transformation et l'export du fer (Theurl et al., 2008). Ainsi, les KCs participent à l'élimination des globules rouges stressés ou sénescents et jouent un rôle majeur dans la régulation du métabolisme du fer.

Dans un contexte d'infection bactérienne transmise par le sang, les KCs sont capables d'interagir avec les plaquettes présentes dans la circulation afin d'éradiquer l'infection. En effet, suite à la phagocytose de la bactérie par les KCs, on observe l'agrégation des plaquettes avec ces KCs et cette collaboration promeut la clairance bactérienne (Wong et al., 2013). Dès lors que les plaquettes deviennent sénescents, les KCs participent aussi à leur élimination de la circulation (Deppermann et al., 2020). Les KCs participent également à la clairance de corps apoptotiques grâce à leur capacité de phagocytose (Surewaard et al., 2016). Elles assurent donc la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes.

Les KCs pourraient également jouer un rôle dans la détoxification du sang voyageant depuis l'intestin vers le foie via la veine porte. Ce sang est susceptible de contenir des endotoxines et même des entéro-pathogènes dans des cas extrêmes. Les KCs sont ainsi capables d'internaliser les métabolites dérivés des bactéries libérés dans la circulation portale (Balmer et al., 2014). Dans certaines conditions pathologiques telles que les maladies métaboliques, une altération de la perméabilité de la barrière intestinale peut être observée et de nombreux PAMPs tels que le LPS ou la flagelline peuvent alors circuler dans le sang portal. De par leur localisation sinusoïdale, les KCs, qui expriment de nombreux TLRs, dont TLR4, pourraient être activées par ces PAMPs et ainsi participer à l'inflammation hépatique en sécrétant des cytokines inflammatoires (TNF, IL-6, IL-10...), des chimiokines (CCL2, CCL5...) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

1.4.3. Cibler spécifiquement les KCs afin de les étudier

L'absence d'outils permettant de cibler spécifiquement les KCs a longtemps constitué un frein à leur étude. Néanmoins, de nouveaux outils et de nouvelles méthodes ont pu être développés ces dernières années afin de mieux appréhender les rôles de ces cellules, notamment dans les pathologies hépatiques chroniques. Les KCs peuvent

être identifiées grâce aux marqueurs F4/80 (Horst et al., 2016) ou CD68 (famille de domaines de lectines), ou du marqueur CD64 plus spécifique des macrophages (Gautier et al., 2012; Ginhoux and Guilliams, 2016b). Cependant ces marqueurs ne permettent pas de distinguer les KCs des éventuels macrophages dérivés des monocytes présents en conditions inflammatoires. Plusieurs études ont montré que les KCs murines expriment de manière spécifique Timd4 (Scott et al., 2016; Theurl et al., 2016), Vsig4 (CRlg) (Beattie et al., 2016; Helmy et al., 2006) ainsi que Clec4f, une lectine de type C (Lavin et al., 2014; Scott et al., 2016; Yang et al., 2013). L'identification de marqueurs spécifiques des KCs représente une avancée majeure puisqu'elle a permis d'optimiser leur étude par la cytométrie en flux mais également de développer plusieurs outils permettant de les cibler de manière spécifique *in vivo*. Ainsi, un modèle murin dans lequel les KCs expriment le récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur du gène *Clec4f* a été généré (Scott et al., 2016). Dans ce modèle, l'administration de toxine diphtérique entraîne une déplétion quasi totale des EmKCs en 24 heures. Suite à cette déplétion et son effet inflammatoire, des monocytes circulants sont recrutés dans le foie et sont alors capables d'adopter progressivement le profil transcriptionnel des KCs d'origine embryonnaire et de rétablir le pool de KCs. Ces KCs dérivées des monocytes (MoKCs) se maintiennent sur le long terme par auto-renouvellement telles que leurs homologues embryonnaires.

Sur la base de ce travail, une lignée de souris *Clec4f-cre* a été établie afin de cibler spécifiquement les KCs. Lorsqu'elles ont été croisées avec des animaux *Zeb2^{fl/fl}*, il a pu être admis que *Zeb2* joue un rôle majeur dans l'identité tissulaire des KCs (Scott et al., 2018). Dans cette même étude, les souris ont aussi été croisées avec des *Nr1h3^{fl/fl}*, gène codant le facteur LXR α , afin de montrer le rôle déterminant de LXR α dans l'identité des KCs et leur survie (Scott et al., 2018). Ainsi, l'utilisation de ce modèle s'avère particulièrement pertinente dans l'étude des fonctions des KCs et permettra de découvrir de nouveaux rôles de ces cellules dans divers contextes physiopathologiques.

II. Pathologies hépatiques aiguës et chroniques

Dans le cadre de ma thèse, je me suis principalement intéressée aux macrophages hépatiques en conditions physiopathologiques. Certaines pathologies hépatiques sont dites aiguës de par leur apparition brutale et leur évolution rapide sur un laps de temps réduit. Les causes principales sont multiples allant de l'infection virale à l'intoxication médicamenteuse. Un versant de ma thèse a ainsi consisté à étudier le rôle de l'inflammation médiée par les cellules de Kupffer dans un modèle murin d'hépatite aiguë. Parmi les pathologies hépatiques chroniques, l'affection la plus fréquente est la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). Elle se définit comme un continuum d'altérations hépatiques allant de la stéatose simple et bénigne à la stéatohépatite non alcoolique (NASH). La NASH est une maladie évolutive caractérisée par un stockage excessif de lipides dans le foie auquel s'ajoute une inflammation chronique voire une fibrose. Une partie de mes travaux de thèse a eu pour but d'étudier la diversité des macrophages hépatiques en termes de phénotypes et de fonctions au cours de la NASH.

II.1. Les pathologies hépatiques aiguës (Acute Liver Failure, ALF)

II.1.1. Définition

L'insuffisance hépatique aiguë se définit comme une lésion hépatique grave, potentiellement mortelle mais qui peut être réversible. Elle survient le plus souvent chez des patients qui ne présentent pas de maladies hépatiques préexistantes diagnostiquées. La rareté de l'ALF ainsi que sa gravité et son hétérogénéité ont conduit à la génération d'une base de données très limitée, cela présente donc des défis uniques en matière de gestion clinique.

La présentation clinique de l'ALF comprend généralement, entre autres, un dysfonctionnement hépatique, des valeurs biochimiques hépatiques anormales et une coagulopathie, menant à un décès dans près de la moitié des cas.

II.1.2. Causes de l'ALF

L'hépatite virale et l'hépatite médicamenteuse constituent les deux causes les plus fréquentes d'ALF dans le monde (Bernal and Wendon, 2013). D'autres causes existent telles que les lésions hépatiques induites par l'hypoxie ou la septicémie.

Les hépatites A et E constituent les principales causes d'ALF induites par les virus, et sont majoritairement observées dans les pays en voie de développement (Acharya et al., 2002). Le virus de l'hépatite B peut aussi parfois provoquer une ALF suite à une infection aiguë ou bien après le début d'un traitement immunosuppresseur menant à la réactivation du virus. Dans ce dernier cas, la survie est particulièrement faible. L'infection au virus de l'hépatite C seul induit quant à elle rarement une ALF. Dans d'autres cas plus rares, le virus de l'herpès simplex (HSV), le cytomégalovirus (CMV) ou le virus d'Epstein-Barr (EBV) peuvent causer une ALF.

Les lésions hépatiques d'origine médicamenteuse représentent une cause majeure d'ALF dans les pays développés. La plus fréquente est celle induite par l'acétaminophène (paracétamol) ingéré en surdose et donc prévisible (Reuben et al., 2016). Parfois, elle peut être imprévisible et se déclarer indépendamment de la dose administrée. L'acétaminophène est également un cofacteur potentiel de lésion hépatique chez les patients présentant une pathologie hépatique sous-jacente et prenant ce médicament. Ainsi, la malnutrition et l'abus d'alcool représentent des facteurs de risque majeur quant à l'hépatotoxicité induite par ce médicament (Heard et al., 2007). Comme les ALF d'origine virale, l'ALF médicamenteuse présente souvent un pronostic sévère et nécessite fréquemment une transplantation hépatique.

L'ALF peut aussi être causée par une ischémie hépatique due à un apport insuffisant de sang oxygéné au foie, comme chez les patients présentant une insuffisance cardiaque grave (Taylor et al., 2012). D'autres causes peuvent être à l'origine de l'ischémie hépatique telles que l'hypotension due au choc septique ou à l'insuffisance pulmonaire. Le pronostic à court terme de l'ALF causée par une ischémie est bon et il est rare qu'elle nécessite le recours à une transplantation hépatique (Heard et al., 2007). Une restauration du volume intravasculaire ainsi qu'une amélioration rapide de l'hémodynamique cardiaque suffisent généralement comme traitement.

II.1.3. Physiopathologie de l'ALF

La physiopathologie de l'ALF dépend de son étiologie. Dans l'ensemble, l'ALF survient lorsque la mort des hépatocytes dépasse la capacité de régénération du foie. La mort des hépatocytes au cours de l'ALF met en jeu les voies de nécrose et/ou d'apoptose. Contrairement à la nécrose des hépatocytes qui est une conséquence de la déplétion d'ATP provoquant un gonflement cellulaire ainsi qu'une rupture de la membrane des cellules, l'apoptose correspond à l'exécution d'un programme de mort dépendant de l'ATP et conduisant à une résorption ordonnée des noyaux et du cytoplasme cellulaire. L'apoptose permet donc de minimiser la réponse inflammatoire, tandis que la nécrose la favorise en relarguant de multiples DAMPs. Dans certaines formes d'ALF, l'apoptose massive des hépatocytes constitue le mode majeur de mort cellulaire. L'apoptose se produit principalement via deux voies de signalisation : une voie extrinsèque médiée par les « death receptors » et une voie intrinsèque médiée par les mitochondries. Les « death receptors » sont des protéines transmembranaires parmi lesquels les plus décrits dans l'ALF sont les récepteurs CD95 (Fas) et TNF-R1 (TNF-receptor 1). La liaison de leur ligands respectifs, FasL et TNF, conduit au recrutement de plusieurs protéines adaptatrices dont FADD (Fas-associated protein with death domain), TRADD (TNF-R1-associated death domain protein) ainsi que la pro-caspase 8. Ces protéines forment alors le complexe DISC (death-inducing signaling complex) dans lequel la caspase 8 est active. Ce complexe DISC suffit à induire la mort cellulaire dans certains types cellulaires, et ce indépendamment de la voie d'apoptose mitochondriale. La voie intrinsèque médiée par les mitochondries, quant à elle, peut être activée par divers signaux intra- ou extracellulaires tels qu'un stress du réticulum endoplasmique, une déficience en facteurs de croissance ou encore un stress oxydatif conduisant à la production de ROS. Suite à la reconnaissance d'un de ces signaux, la voie de signalisation intrinsèque conduit à l'activation de Bax et Bak, des protéines pro-apoptotiques membres de la famille Bcl-2. Ces protéines induisent un dysfonctionnement mitochondrial à l'origine du relargage dans le cytoplasme de plusieurs facteurs apoptogéniques qui contribuent à l'activation de protéases et à la dégradation de la chromatine. Cette forme d'apoptose a en commun avec la nécrose le fait qu'elle met en jeu un dysfonctionnement mitochondrial. Lors de la nécrose, on observe une augmentation de la perméabilité membranaire des mitochondries et une déplétion en ATP intracellulaire. Ces processus aboutissent au gonflement des

mitochondries et à la rupture de la membrane mitochondriale externe. De plus, une forte augmentation des concentrations de calcium intracellulaire et la formation de ROS contribuent également à la nécrose. La nécrose conduisant à la libération du contenu intracellulaire, celle-ci est donc généralement associée à de l'inflammation. Elle s'oppose ainsi à l'apoptose au cours de laquelle les cellules apoptotiques sont rapidement éliminées par les phagocytes, sans générer d'inflammation incontrôlée.

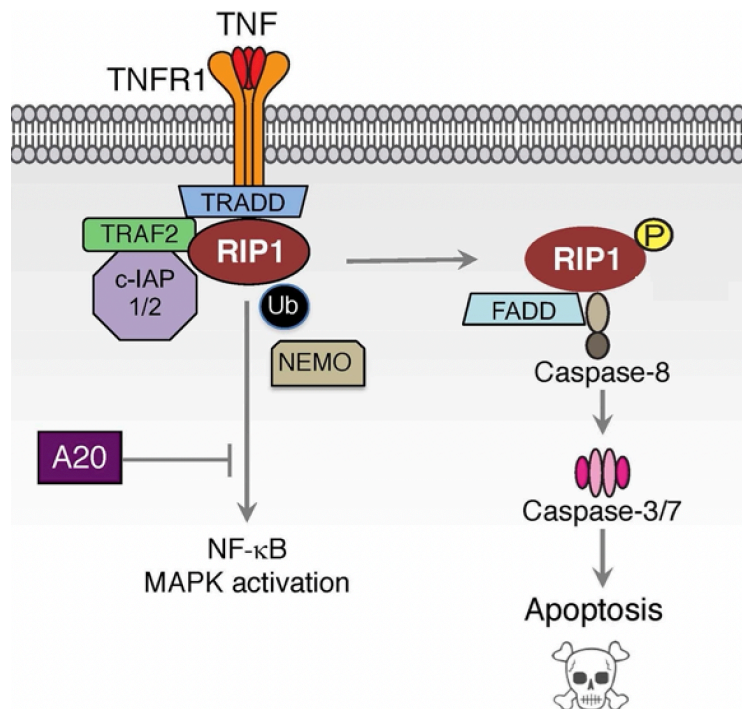


Figure 10. Mécanismes de mort cellulaire induits par la cytokine TNF.

Des changements environnementaux peuvent être à l'origine de modifications post-traductionnelles de la protéine RIP1 notamment et basculer la signalisation de TNF de l'expression de gènes inflammatoires vers la mort cellulaire par apoptose. Ainsi, le statut d'ubiquitination de RIP1 détermine la balance de cette signalisation dépendante de TNF entre l'activation de gènes pro-survie et la mort cellulaire. Suite à l'ubiquitination de RIP1, un complexe intracellulaire est assemblé. Ce complexe formé dans la voie d'apoptose cellulaire dépendante de RIP1 est centré autour de la caspase 8 et de la protéine FADD (Fas-associated death domain).

Adapté de (Webster and Vucic, 2020)

Les cytokines jouent un rôle majeur dans les lésions hépatocytaires observées dans un contexte d'ALF. En effet, on observe dans l'ALF un dérèglement du réseau de cytokines (Trautwein and Koch, 2013). Il a été montré que les cytokines TNF et IL-6

étaient fortement élevés dans le foie et le sérum des patients atteints d'ALF (Chastre et al., 2012). La cytokine IL-6 est l'un des principaux inducteurs de la réponse en phase aiguë dans les hépatocytes (Streetz et al., 2001). La cytokine TNF quant à elle peut favoriser l'apoptose mais aussi la nécrose des hépatocytes. L'inflammation joue ainsi un rôle central dans la mort des hépatocytes au cours de l'ALF. Ainsi, chez les patients atteints d'ALF, les taux sériques de TNF sont directement corrélés au pronostic des patients (Chastre et al., 2012). De plus, dans les modèles murins d'ALF, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-TNF permet d'atténuer la sévérité de la pathologie. Ainsi, les cytokines TNF et IL-6 jouent un rôle central dans la pathogenèse de l'ALF.

II.1.4. Traitements de l'ALF

En général, les patients présentant des lésions hépatiques hyperaigües ont une meilleure survie à court terme que les patients présentant des lésions hépatiques à évolution lente. Le pronostic de l'ALF dépend de la durée de la pathologie mais la cause de la lésion reste le prédicteur principal de l'évolution de l'ALF. Dans le cas d'une ALF induite par de l'acétaminophène, un traitement à l'acétylcystéine permet de prévenir les lésions hépatiques si elle est prise dans les 12 heures suivant l'ingestion de paracétamol (Waring, 2012). Les taux de survie se sont considérablement améliorés ces dernières années grâce aux progrès de la prise en charge en soins intensifs et au recours à la transplantation hépatique qui est utilisée chez près de 30% des patients souffrant d'ALF et constitue toujours une alternative vitale à la prise en charge médicale.

II.1.5. Modèles murins de l'ALF

La disponibilité de modèles expérimentaux adéquats est d'une importance cruciale afin de mieux comprendre cette affection et de tester l'efficacité de nouvelles interventions thérapeutiques. Nous décrivons les principaux modèles utilisés dans la littérature ci-dessous.

a) ALF induite par une surdose en acétaminophène

Un des modèles murins qui reproduit fidèlement la physiopathologie des lésions hépatiques de l'ALF observée chez l'homme est le surdosage aigu en acétaminophène (Davis et al., 1974; McGill et al., 2012; Xie et al., 2014). En conditions normales, l'acétaminophène est métabolisé par le foie où il subit une biotransformation et est ensuite excrété par les reins. En cas d'excès, ces voies sont saturées et l'acétaminophène est métabolisé par le système enzymatique du cytochrome P450 (Black, 1980; Boyd and Berezcky, 1966; Boyd and Hogan, 1968; Davidson and Eastham, 1966). Cela conduit à la formation d'un métabolite réactif, la N-acétyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) sur lequel repose le mécanisme de toxicité de l'acétaminophène. En effet, si ce composé n'est pas rapidement conjugué avec du glutathion endogène, il provoque alors de sévères lésions cellulaires dues à la nécrose des hépatocytes (Corcoran et al., 1980; Jollow et al., 1974; Mohandas et al., 1981). En effet, le NAPQI se lie aux protéines mitochondriales ce qui entraîne la formation d'adduits protéiques et favorise le déclenchement du stress oxydant mitochondrial. La combinaison de ce dysfonctionnement mitochondrial massif et des dommages à l'ADN constitue les principales causes de la nécrose dans ce modèle d'ALF (Gujral et al., 2002).

b) ALF induite par l'activation du récepteur de mort Fas

Le récepteur Fas est une glycoprotéine transmembranaire membre de la famille des récepteurs du TNF. Ce récepteur comporte un « death domain » (domaine de mort) lui permettant d'assembler un complexe de signalisation induisant la mort cellulaire par apoptose. Certaines cellules exprimant le récepteur Fas, et notamment les hépatocytes, peuvent donc entrer en apoptose suite à la liaison du ligand FasL à son récepteur. Ainsi, l'administration de FasL à des souris constitue un modèle d'apoptose hépatocellulaire et d'ALF. Dans la première heure suivant l'administration du ligand de Fas, on observe une apoptose sélective avec des modifications morphologiques telles que le rétrécissement des cellules, la condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques. En parallèle, des modifications biochimiques sont également observées telles que l'augmentation des activités enzymatiques, la fragmentation de l'ADN nucléaire mais sans libération d'enzymes

hépatiques telles que l'alanine aminotransférase (ALT). Dans un deuxième temps, l'apoptose massive laisse place à une nécrose secondaire caractérisée par une libération importante d'ALT, une hémorragie puis finalement aboutit à la mort de l'animal (Bajt et al., 2000; Ogasawara et al., 1993). Ce modèle a été particulièrement étudiée afin de mieux comprendre les mécanismes de signalisation de l'apoptose notamment dans les maladies auto-immunes (Singer et al., 1994; Steinberg, 1994), mais aussi dans les cancers (Hammam et al., 2012; Kim et al., 2004).

c) ALF induite par le traitement LPS – D-Galactosamine

La co-injection de lipopolysaccharide (LPS) à faible dose et de D-Galactosamine (D-GalN) constitue un modèle expérimental largement utilisé dans l'étude des ALF (Galanos et al., 1979). Le D-GalN est un sucre aminé qui entraîne une déplétion des nucléotides d'uridine ainsi qu'une inhibition de la synthèse d'ARNm lorsqu'il est métabolisé par les hépatocytes. Les hépatocytes sont donc incapables de synthétiser des gènes anti-apoptotiques, et ce pendant plusieurs heures (Decker and Keppler, 1974). Le D-GalN sensibilise ainsi les hépatocytes à la mort cellulaire. Dans le même temps, le LPS induit la production de cytokine pro-inflammatoires ($TNF\alpha$, IL-6 et IL-1 β) capables d'induire l'apoptose des hépatocytes sensibilisés par le D-GalN (Mignon et al., 1999). Ainsi l'administration de D-GalN couplée à une faible dose de LPS peut entraîner la mort de l'animal en quelques heures seulement. Afin de protéger les souris de la létalité, l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-TNF s'est avéré particulièrement efficace (Nowak et al., 2000). Un traitement à l'uridine permet aussi de protéger les souris de l'hépatotoxicité induite par le LPS/D-GalN.

Ce modèle est particulièrement utile pour étudier les mécanismes de l'inflammation menant à la mort par apoptose des hépatocytes. Son principal avantage, outre sa capacité à reproduire la pathogenèse de l'ALF observée chez l'homme, est sa rapidité d'exécution ainsi que sa reproductibilité. Ce modèle a permis d'acquérir de nouvelles connaissances fondamentales sur les mécanismes des lésions hépatiques associés à l'ALF. Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'utiliser ce modèle afin de mieux comprendre le rôle de l'inflammation médié par les KCs dans la mortalité induite par le LPS/D-GalN.

II.2. L'insuffisance hépatique aigüe sur maladie chronique

L'insuffisance hépatique aigüe sur maladie chronique (Acute-on-chronic liver failure, ACLF) est une condition grave observée chez les patients atteints d'une pathologie hépatique chronique connue et présentant une décompensation aigüe.

La pathophysiologie de l'ACLF est encore largement inconnue. L'inflammation systémique pourrait y jouer un rôle prépondérant. En effet, les patients atteints de ce syndrome présentent une inflammation systémique et un stress oxydatif important (Clària et al., 2016; Fernández et al., 2018). Des études ont montré que l'intensité de l'inflammation systémique était directement corrélée à la gravité du syndrome (Clària et al., 2016). Le terme d'ACLF est né d'études montrant le développement d'un syndrome associé à un risque élevé de décès chez des patients atteints d'une cirrhose (Jalan and Williams, 2002). Trois éléments majeurs caractérisent ce syndrome : (1) il survient dans un contexte d'inflammation systémique intense, (2) il se développe fréquemment suite à un événement pro-inflammatoire (par exemple des infections ou une hépatite alcoolique), (3) il peut être associé à la défaillance d'un ou plusieurs organes.

Chez la moitié des patients présentant une ACLF, l'événement aigu déclencheur est une infection. Les microbes responsables sont le plus souvent des bactéries, mais des champignons peuvent aussi être impliqués (Fernández et al., 2018). De plus, chez 40% des patients atteints de cirrhose et présentant une inflammation systémique ainsi qu'une ACLF on peut observer la translocation de produits dérivés des bactéries de la lumière intestinale vers la circulation systémique (Fernández et al., 2019). Les patients atteints de cirrhose présentent des taux plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires plus élevées que les patients sans cirrhose. Chez des monocytes de patients atteints de cirrhose, la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires stimulée par le LPS est plus élevée que dans les individus sains (Gandoura et al., 2013; Tazi et al., 2006). Les mécanismes de l'orage de cytokines induite par le LPS et associée à la cirrhose demeurent mal compris même s'il a été suggéré qu'un défaut dans le rétrocontrôle négatif de la signalisation TLR4 pourrait expliquer ces observations (Guo and Friedman, 2010). Des études *in vivo* ont montré que les taux plasmatiques de TNF sont significativement plus élevés chez les animaux cirrhotiques que chez les animaux non cirrhotiques suite à une stimulation au LPS (Heller et al., 2000; Thabut et al.,

2007). De plus, les animaux cirrhotiques développent une apoptose et une nécrose des hépatocytes en réponse au LPS, ce qui n'est pas le cas des animaux non cirrhotiques (Tazi et al., 2007). Il a aussi été montré que dans les foies cirrhotiques, le LPS provoquait un stress prolongé du réticulum endoplasmique menant à la phosphorylation soutenue du facteur eIF2 α (Tazi et al., 2007). Or, la phosphorylation de eIF2 α est connue pour limiter la traduction de la plupart des ARN (Malhi and Kaufman, 2011). Dans ces conditions, la mort cellulaire des hépatocytes médiée par le TNF dans les foies cirrhotiques pourraient s'expliquer par l'absence de traduction en protéines des ARNm de gènes de survie dépendant du facteur NF- κ B. L'ensemble de ces résultats a conduit à la théorie selon laquelle dans la cirrhose, la reconnaissance du LPS pourrait entraîner des lésions hépatiques graves dues non seulement à une réponse immunitaire innée excessive mais aussi à l'altération des mécanismes impliqués dans l'homéostasie du réticulum endoplasmique des hépatocytes.

11.3. La stéatohépatite non-alcoolique (NASH) comme prototype des pathologies hépatiques chroniques

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) regroupe un large spectre de lésions hépatiques allant d'une stéatose bénigne à une stéatohépatite non alcoolique (NASH) et pouvant même évoluer vers une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire. La NASH représente un enjeu sanitaire majeur car son incidence est en constante augmentation dans le monde. Les options thérapeutiques actuelles étant limitées, une meilleure compréhension des mécanismes contribuant à la pathogenèse de la NASH devrait faciliter la conception de médicaments innovants.

11.3.1. Épidémiologie

La NAFLD couvre un large spectre d'affections hépatiques dont les manifestations cliniques ne deviennent problématiques qu'au stade de la NASH, lorsque les lésions hépatiques, l'inflammation et la fibrose se superposent à la stéatose initiale (Friedman et al., 2018). Les projections actuelles estiment que d'ici 2030 plus de 300 millions d'individus développeront une NAFLD en Chine, plus de 100 millions aux Etats-Unis

et 15-20 millions dans les principaux pays européens (Estes et al., 2018). Le coût économique actuel associé à la NAFLD et à ses comorbidités étant extrêmement élevés (O'Hara et al., 2020; Schattenberg et al., 2021; Younossi et al., 2016a), des efforts considérables sont déployés pour la mise au point de traitements novateurs afin de lutter contre cette maladie, pour laquelle il n'existe aujourd'hui aucun traitement approuvé (Vuppalanchi et al., 2021).

11.3.2. Spectre de la NAFLD

La NAFLD est considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique et est fortement associée à des comorbidités métaboliques, notamment l'obésité, le diabète de type 2, l'hyperlipidémie et l'hypertension (Younossi et al., 2016b). Le syndrome métabolique est la cause la plus courante de pathologie hépatique chronique. On estime que ce syndrome est présent chez environ 25% de la population mondiale adulte (Younossi et al., 2016b). La NAFLD est une maladie progressive où la stéatose (accumulation excessive de lipides dans les hépatocytes) constitue le premier stade de la pathologie, qui peut éventuellement évoluer vers le stade plus complexe de la NASH. La NASH se caractérise par la présence d'une stéatose hépatique (affectant plus de 5% des hépatocytes), de lésions hépatocellulaires (avec un gonflement caractéristique des hépatocytes), de signes d'inflammation et de degrés variables de fibrose (Friedman et al., 2018). Cette maladie présente une grande hétérogénéité dans ses manifestations cliniques et son évolution (Eslam et al., 2020). En effet, les patients atteints de NASH et de fibrose avancée, soit 10 à 20% des patients atteints de NAFLD (Angulo et al., 2015; Ekstedt et al., 2015), peuvent ensuite évoluer vers une cirrhose, un CHC et une maladie hépatique en phase terminale nécessitant potentiellement une transplantation hépatique (Pais et al., 2016). La NASH constitue donc une étape clé dans la progression clinique de la NAFLD.

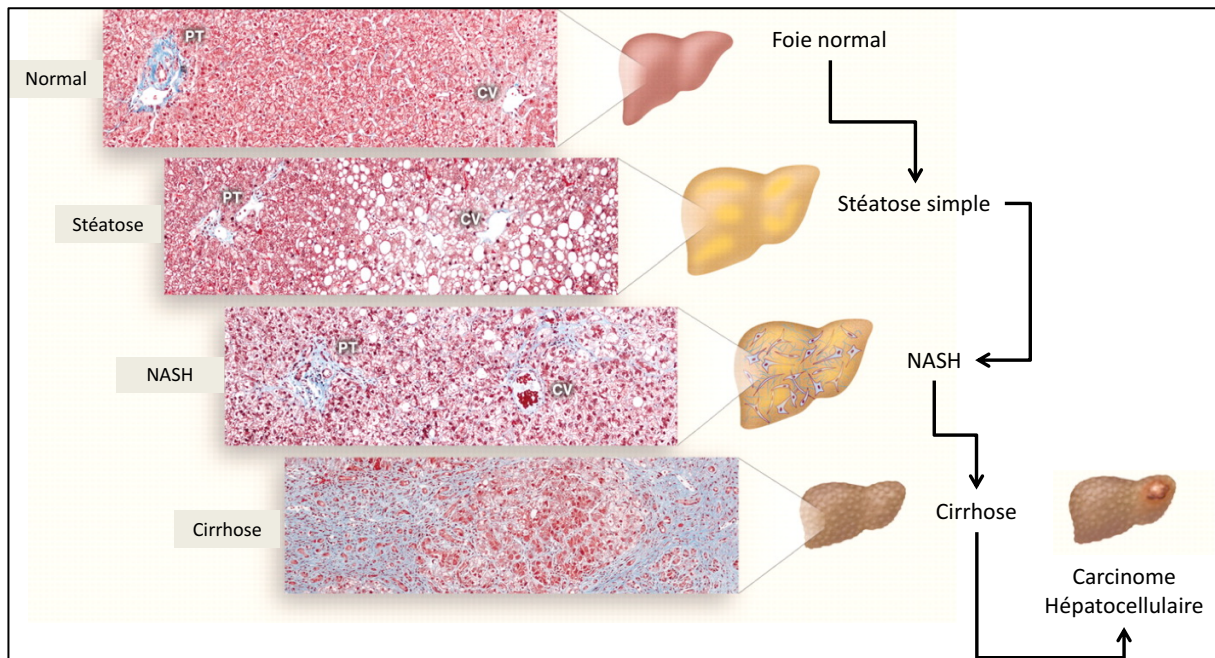


Figure 11. Spectre de la NAFLD et lésions hépatiques associées.

Des coupes histologiques illustrent ici les différents stades de la NAFLD. Les gouttelettes lipidiques sont les zones non colorées alors que les fibres de collagène sont colorées en bleu par le trichrome de Masson. La NAFLD inclue notamment la stéatose simple ainsi que la stéatohépatite non alcoolique (NASH) qui peut évoluer vers une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire. L'accumulation de triglycérides au sein des hépatocytes définit l'état de stéatose. La NASH se caractérise quant à elle comme une stéatose couplée à de l'inflammation, de la mort cellulaire ainsi qu'à une fibrose. Lorsque cette fibrose s'étend de façon considérable et irréversible, on parle alors de cirrhose.

Adapté de (Cohen et al., 2011)

11.3.3. Physiopathologie de la NASH

La NASH est une maladie multifactorielle complexe dont l'étiologie exacte n'est pas encore complètement comprise. La stéatose hépatique, caractérisée par un stockage accru des triglycérides dans le foie, peut résulter de la circulation des acides gras libres libérés lors de la lipolyse du tissu adipeux, mais aussi de la synthèse hépatique des acides gras par lipogénèse *de novo* (Donnelly et al., 2005). L'un des principaux substrats de la lipogénèse *de novo* est le fructose (Softic et al., 2016), qui est parfois utilisé en association avec les graisses dans les modèles murins de la NASH induits par régime alimentaire. En plus d'entretenir la lipogénèse *de novo*, le fructose

augmente également la perméabilité intestinale, ce qui peut entraîner une inflammation hépatique. L'association de la lipogenèse *de novo* à une augmentation de la perméabilité intestinale précipite l'apparition de la NASH ainsi que la transition de la NASH vers le CHC (Todoric et al., 2020).

Globalement, les données indiquent que l'accumulation hépatique de triglycérides et de cholestérol crée un environnement propice au développement de la NASH. Les stress médiés par les lipides peuvent induire des lésions hépatiques en augmentant la sensibilité des hépatocytes à l'apoptose. En effet, la stéatose induite par un régime HFD à long terme sensibilise les hépatocytes à la mort cellulaire induite par les cytokines (Imajo et al., 2012). Chez l'homme, l'apoptose des hépatocytes est plus importante chez les patients atteints de NASH que chez ceux atteints d'une simple stéatose, ce qui est en corrélation avec des niveaux élevés de fibrose et d'inflammation (Feldstein et al., 2003). Cependant, d'autres types de mort cellulaire comme la nécroptose pourraient également survenir au cours de la NASH et contribuer à sa pathogenèse (Schwabe and Luedde, 2018). Chez la souris, la mort des hépatocytes peut à elle seule déclencher le développement de la NASH (Luedde et al., 2007). De plus, il est important de noter que l'inflammation joue un rôle crucial dans la mort des hépatocytes au cours de la NASH. En effet, en limitant la signalisation induite par le TNF, on réduit la mort des hépatocytes ainsi que les lésions hépatiques, ce qui se traduit par une réduction de la stéatose et de la fibrose hépatique (Wandrer et al., 2020). Ainsi, la mort des hépatocytes constitue une caractéristique déterminante de la pathogenèse de la NASH.

Ainsi la charge lipidique des hépatocytes et l'inflammation fonctionnent ensemble au cours de la NASH pour induire la mort des hépatocytes, ce qui conduit à des lésions hépatiques, une inflammation accrue et une fibrose tissulaire. Le rôle majeur de l'inflammation dans ces processus suggère que l'environnement hépatique, riche en cellules immunitaires, peut moduler l'apparition et la gravité de la NASH.

11.3.4. Modélisation de la NASH

Divers modèles animaux sont utilisés pour étudier la NAFLD et la transition de la NASH vers le CHC. Toutefois, les modèles reposant sur l'utilisation de régimes alimentaires demeurent très largement les plus utilisés.

L'association étroite qui existe entre la NAFLD et la suralimentation, l'obésité et la résistance à l'insuline a contribué à l'émergence de divers modèles induits par des régimes. Ces régimes utilisent des formules diététiques enrichies en lipides. Les souris nourries avec un régime riche en graisses (HFD) développent généralement une stéatose hépatique mais présentent une inflammation limitée et aucune fibrose n'est observable. Or l'inflammation et la fibrose hépatique constituent des composants clés de la NASH (Matsumoto et al., 2013). Afin de remédier à ce biais, le régime HFD a été supplémenté avec du cholestérol, des acides gras saturés tels que du palmitate ou du fructose et/ou du saccharose afin d'accentuer l'insulino-résistance hépatique, l'inflammation et la fibrose (Anstee et al., 2019; Ganz et al., 2015; Remmerie et al., 2020; Wang et al., 2020). Ces régimes supplémentés, en particulier ceux enrichis en graisses, en cholestérol et en fructose et/ou saccharose, sont souvent caractérisés de « régimes occidentaux », bien que leur composition n'ait pas été normalisée et donc varie selon les laboratoires. Une récente analyse systémique de la littérature sur les modèles murins de NAFLD suggère que les régimes riches en graisses et en fructose récapitulent le mieux les caractéristiques générales de la NAFLD humaine (Im et al., 2021). Les régimes déficients en méthionine et/ou choline ont été largement utilisés dans la recherche préclinique sur la NASH (Anstee et al., 2019; Hansen et al., 2017). La choline est requise pour la sécrétion hépatique de triglycérides sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL), et sa déficience limite l'export des lipides du foie vers les tissus périphériques et favorise donc leur accumulation au niveau des hépatocytes. La méthionine est, quant à elle, indispensable à la β -oxydation mitochondriale hépatique des acides gras et son absence entraîne un stress oxydant favorisant l'inflammation hépatique. Le régime MCD induit donc à la fois une stéatose et de l'inflammation qui favorise le développement d'une fibrose hépatique, caractéristique de la NASH. De plus, le régime MCD enrichi en graisses et en saccharose favorise l'apparition rapide d'une stéatose macrovésiculaire hépatique, d'une inflammation lobulaire et d'une fibrose péri-sinusoïdale, ce qui récapitule les changements ultrastructuraux observés dans la NASH humaine (Machado et al., 2015). Le principal inconvénient de ce régime MCD réside dans l'hypercatabolisme qu'il induit conduisant à une perte de poids et l'absence de résistance à l'insuline. Ainsi un régime déficient en choline supplémenté par des niveaux élevés de graisses (60% des calories apportées par les graisses) aussi connu sous le nom de régime HFD-CD a été mis au point pour remplacer le régime MCD. Le régime HFD-CD augmente la

masse grasse sur le long terme et altère l'homéostasie du glucose tout en induisant une stéatose sévère, un ballonnement des hépatocytes, une infiltration de cellules immunitaires, la formation de corps de Mallory-Denk et autant de caractéristiques de la NASH humaine (Wolf et al., 2014).

II.4. Les macrophages dans les pathologies hépatiques

II.4.1. Les macrophages hépatiques dans les pathologies aiguës

L'ALF se caractérise par la mort rapide et massive des hépatocytes par nécrose et/ou apoptose (Antoine et al., 2009; Possamai et al., 2013) et conduit à la libération de DAMPs (Woolbright and Jaeschke, 2017). De par leur nature hautement phagocytaire et la pléthore de PRR présents à leur surface (Beattie et al., 2016; Scott et al., 2016, 2018), les KCs ont la capacité d'identifier et de répondre rapidement aux pathogènes, PAMPs et DAMPs qui pénètrent dans le foie par la circulation sanguine (Crispe, 2009; Krenkel and Tacke, 2017; Kubes and Jenne, 2018). De plus, grâce à leurs interactions avec les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC), les cellules étoilées (HSC) et les hépatocytes (Bonnardel et al., 2019; Gola et al., 2021; Sakai et al., 2019), les KCs peuvent jouer un rôle important dans l'orchestration de la réponse hépatique aux lésions tissulaires et à l'inflammation. Ainsi, les KCs peuvent notamment détecter les DAMPs libérés par les cellules hépatiques mourantes ou endommagées, tout en communiquant avec ces cellules afin d'ordonner les réponses appropriées.

Dans l'inflammation stérile, l'événement initial de la réponse inflammatoire consiste en la reconnaissance par les KCs de DAMPs tels que HMGB1 (Gaskell et al., 2018). De nombreuses études ont rapporté que lors de leur rencontre avec des stimuli inflammatoires, les KCs produisaient des cytokines, des chimiokines ainsi que d'autres médiateurs tels que les facteurs du complément et des prostaglandines (Krenkel and Tacke, 2017; Woolbright and Jaeschke, 2017). Dans le cas d'un surdosage à l'acétaminophène, ce sont le stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondrial induits dans les hépatocytes qui conduisent à la libération de DAMPs pouvant être reconnus par les KCs. Une fois activées, les KCs sécrètent des cytokines pro-

inflammatoires telles que $TNF\alpha$, des ROS, et des chimiokines comme CCL2. Ces médiateurs vont amplifier le signal pro-inflammatoire et induire le recrutement de monocytes et de neutrophiles principalement. Dans ce modèle de surdosage à l'acétaminophène, il semblerait que les KCs aient un effet protecteur sur les lésions hépatiques. En effet, suite à la déplétion non spécifique des KCs avec des liposomes contenant du clodronate, on observe une augmentation des taux sériques d'ALT (Campion et al., 2008; Ju et al., 2002). Suite à l'administration d'acétaminophène, il a été montré que seule une partie des KCs sont activées (Zigmond et al., 2014). Cette observation pourrait notamment s'expliquer par la mort des KCs peu de temps après leur activation, ce qui concorde avec la réduction du nombre de KCs rapportée dans les cas d'inflammations hépatiques stériles et induites par des agents pathogènes (Bain and Mowat, 2014; Blériot et al., 2015; Daemen et al., 2021; Devisscher et al., 2017; Remmerie et al., 2020; Rolot et al., 2019). Par conséquent, l'effet protecteur attribué aux KCs dans ce contexte pourrait être celui des macrophages inflammatoires temporaires recrutés lors de l'inflammation hépatique. Par ailleurs, il est à noter qu'aucune KC dérivée des monocytes n'a été observée après un surdosage à l'acétaminophène, malgré le fait qu'une réduction du nombre de KCs résidentes a été souligné, suggérant une disponibilité au sein de la niche (Graubardt et al., 2017; Zigmond et al., 2014). Il semblerait donc qu'après une surdose d'acétaminophène, la restauration du pool de KCs repose essentiellement sur la prolifération des KCs embryonnaires restantes (Zigmond et al., 2014).

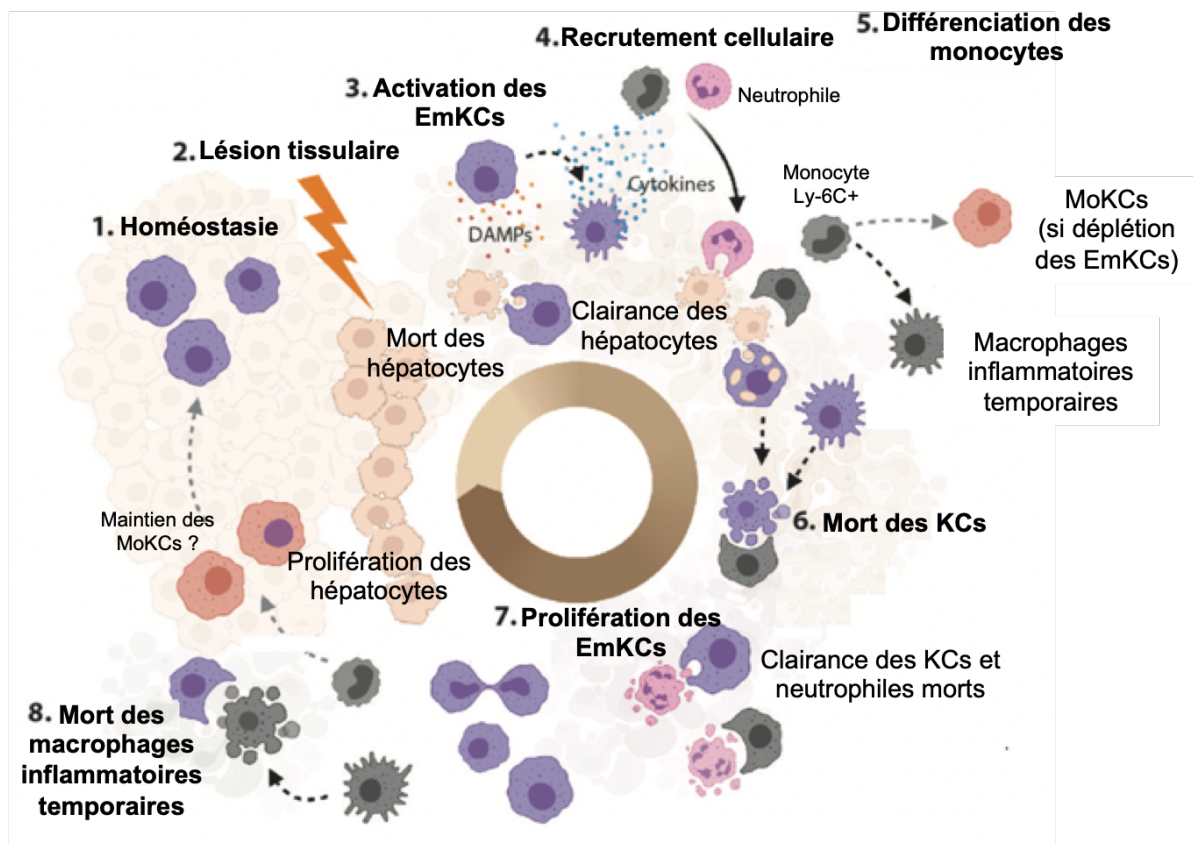


Figure 12. Cellules de Kupffer dans les lésions hépatiques aiguës.

La mort des hépatocytes suite à des lésions tissulaires entraînent la libération de DAMPs. Les EmKCs expriment à leur surface des récepteurs tels que le TLR4 capable de reconnaître ces DAMPs. Une fois activées, les EmKCs produisent de nombreuses cytokines et chimiokines qui vont favoriser le recrutement de monocytes et de neutrophiles. Les monocytes Ly-6C+ recrutés vont pouvoir se différencier en MoKCs dans le cas d'une déplétion des EmKCs, ou en macrophages inflammatoires temporaires. Ces cellules immunitaires vont permettre la clairance des hépatocytes morts. Une fois leur action terminée, elles vont être à leur tour éliminer du tissu. Les EmKCs restantes prolifèrent et dans le cas d'apparition de MoKCs, ces derniers se maintiennent dans le tissu après résolution de l'inflammation.

Adapté de (Zwicker et al., 2021)

Dans le modèle d'ALF induite par le LPS et le D-galactosamine, plusieurs études mettent en évidence le rôle joué par les KCs dans la pathogenèse de l'hépatite fulminante. Cependant, les approches expérimentales utilisées ne sont pas spécifiques des KCs et nécessitent donc de nouvelles études. Dans l'étude de Zheng, la déplétion non spécifique des KCs au chlorure de gadolinium protège de la mortalité induite par ce modèle, ce qui suggère que les KCs aggravent la pathologie (Zheng et al., 2018). De même, l'inhibition de la production de $TNF\alpha$ protège l'animal de l'hépatite fulminante. (Wolf et al., 2005). Il a aussi été montré que l'administration d'IL-6 en

traitement préventif permettait d'atténuer les lésions hépatiques induites par le LPS-D-GalN (Li et al., 2017). Par ailleurs, une étude a montré qu'un traitement à l'IL-35 visant à augmenter la production d'IL-10 dans les macrophages permettait aussi de limiter les effets délétères de l'ALF induite par le LPS / D-GalN (Zheng et al., 2018). Outre leur capacité pro-inflammatoire, les KCs se caractérisent par leur dualité fonctionnelle. En effet, il a été suggéré que les KCs représentent la source principale d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire (Breous et al., 2009; Emmanuilidis et al., 2001). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de la production d'IL-10 dépendante des KCs dans l'ALF à l'aide de modèles spécifiques. Aussi, le rôle délétère des cytokines TNF α et IL-6 dans la pathogenèse de l'ALF étant établi (Chastre et al., 2012; Streetz et al., 2001), il serait intéressant de démontrer la source cellulaire à l'origine de leur production.

Ainsi, l'ensemble de ces études soulignent le rôle des macrophages hépatiques dans la pathogenèse des ALF. Dans certains contextes comme lors d'un surdosage à l'acétaminophène, ils semblent jouer un rôle protecteur, tandis que dans d'autres ils peuvent favoriser leur développement.

II.4.2. Les macrophages hépatiques dans la NASH

Jusqu'ici, le rôle des macrophages dans la NASH consiste à promouvoir l'inflammation hépatique et ainsi favoriser la progression de cette pathologie. La déplétion de l'ensemble des macrophages atténue le développement de la NASH dans des modèles murins (Huang et al., 2010; Reid et al., 2016). Cependant, ces effets n'ont pas été directement attribués aux KCs. Par ailleurs, jusqu'alors peu d'études ne se sont intéressées à la diversité des macrophages hépatiques dans la NASH par faute d'outils permettant de distinguer ces différentes populations. Récemment, plusieurs récentes études, dont mes travaux de thèse, se sont intéressées à l'homéostasie des KCs et à l'hétérogénéité des macrophages hépatiques au cours de la NASH.

Le point commun constaté par l'ensemble des études s'intéressant aux KCs dans la NAFLD et la NASH est la diminution du nombre des EmKCs dans la NASH (Daemen et al., 2021; Devisscher et al., 2017; Remmerie et al., 2020; Seidman et al., 2020; Tran et al., 2020). Cette diminution du nombre d'EmKCs dans la NASH serait notamment due à la perte d'identité des KCs due à une altération de la signalisation LXR α (Seidman et al., 2020). En effet, LXR α a récemment été décrit comme un facteur de

transcription contrôlant la survie des KCs à l'état homéostatique (Sakai et al., 2019). Ce récepteur nucléaire est notamment connu pour contrôler l'homéostasie lipidique dans les macrophages (Tall and Yvan-Charvet, 2015). Ainsi, la perte d'identité des KCs observée lors de la NASH peut être la conséquence de modifications du microenvironnement local à l'origine de l'altération des signaux transmis aux KCs. En effet, dans un environnement hépatique riche en lipides, caractéristique de la NASH, la détection des dérivés du cholestérol par le récepteur LXR α est cruciale pour le maintien de l'identité des KCs mais également pour leur survie (Sakai et al., 2019; Scott et al., 2018; Seidman et al., 2020).

Dans ce contexte de NASH, les monocytes circulants peuvent être recrutés dans le foie et s'y différencier en KCs (MoKCs) afin de repeupler le pool de macrophages résidents du foie (Devisscher et al., 2017; Remmerie et al., 2020; Seidman et al., 2020; Tran et al., 2020). Toutefois, les différences fonctionnelles entre les EmKCs et les MoKCs dans un contexte de NASH n'ont pas été clairement abordées, hormis dans mon étude de thèse que je présente plus bas dans la partie Résultats.

S'ils ne deviennent pas des MoKCs, les monocytes recrutés dans le foie peuvent prendre une autre voie et se différencier en macrophages inflammatoires temporaires (MoDMacs - monocyte-derived macrophages). Les facteurs régulant cette différenciation restent à déterminer. Cependant, il est fort probable que ce processus dépende du microenvironnement local dans lequel les monocytes sont recrutés, notamment des interactions entre cellules et des concentrations de métabolites présents. Dans le cadre de la NASH, les macrophages inflammatoires dérivés des monocytes ressemblent aux macrophages associés aux lipides dits LAMs (lipid-associated macrophages) (Daemen et al., 2021; Remmerie et al., 2020) précédemment décrits dans l'obésité. Il a été montré que ces macrophages étaient particulièrement représentés dans des structures en couronne (hCLS) (Daemen et al., 2021). Ces structures se définissent comme des entités histologiques spécifiques constituées de macrophages entourant des hépatocytes apoptotiques riches en lipides, caractéristiques de la NASH (Itoh et al., 2013). Quant à l'impact de ces macrophages LAMs dans la NASH, celui-ci n'a pas encore été concrètement établi. Ainsi, le récent développement de nouvelles approches permettant de cibler les différentes populations de macrophages hépatiques dans un contexte de NASH

devrait permettre d'approfondir leurs rôles distincts dans le développement et la progression de cette pathologie.

Objectifs du travail de thèse

Les cellules de Kupffer (KCs), macrophages résidents du foie, sont des cellules d'origine embryonnaire. En conditions d'homéostasie chez l'adulte, les KCs se maintiennent par prolifération locale, indépendamment des monocytes circulants. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la capacité des KCs à se maintenir dans un contexte de stéatohépatite non-alcoolique (NASH). La NASH est l'une des affections hépatiques les plus répandues de nos jours. C'est une pathologie évolutive qui se caractérise par un stockage excessif de lipides dans le foie (stade stéatose) auquel s'ajoute une inflammation hépatique chronique. Jusqu'alors, peu d'études se sont intéressées à la diversité des macrophages hépatiques en conditions physiopathologiques par faute d'outils permettant de distinguer ces différentes populations.

Les objectifs de ma thèse étaient donc les suivants :

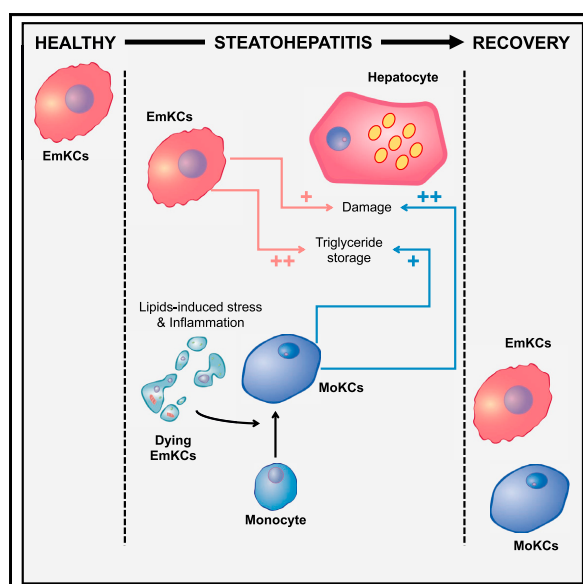
- 1) Définir les différentes populations de macrophages hépatiques et être capable de les différencier
- 2) Étudier la diversité de ces macrophages hépatiques, et notamment des KCs, dans un modèle murin de la NASH
- 3) Déterminer le rôle de l'altération de l'homéostasie des KCs sur le stockage des lipides et la souffrance hépatique au cours de la NASH

Dans un second projet, je me suis intéressée au rôle de l'inflammation médiée par les KCs dans un contexte d'insuffisance hépatique aiguë (ALF). L'ALF, définie par son apparition brutale et rapide, se caractérise par une mort rapide et massive des hépatocytes par nécrose et/ou apoptose. La mort des hépatocytes conduit à la libération de DAMPs pouvant activer les KCs via leur récepteur TLR4. Dans cette étude, mon objectif était de déterminer le rôle de l'activation des KCs dans un modèle murin d'insuffisance hépatique aiguë mais aussi dans des modèles d'insuffisance hépatique aiguë sur maladie chronique. Je présenterais par la suite les données préliminaires obtenues pour ce projet.

Immunity

Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis

Graphical Abstract



Authors

Sophie Tran, Ines Baba, Lucie Poupel, ..., Florian Sennlaub, Thierry Huby, Emmanuel L. Gautier

Correspondence

emmanuel-laurent.gautier@inserm.fr

In Brief

How NASH impacts on embryo-derived Kupffer cell (EmKC) homeostasis remains ill defined. Tran and colleagues demonstrate that EmKC self-renewal is impaired during NASH, leading to EmKC replacement by monocyte-derived KCs (MoKCs) that alter the liver response to lipid overload.

Highlights

- NASH alters Kupffer cell self-renewal by causing their death
- Monocyte-derived KCs (MoKCs) contribute to the KC pool during NASH
- MoKCs maintain on the long term after NASH regression
- MoKCs are more inflammatory than EmKCs and alter the liver response during NASH



Tran et al., 2020, *Immunity* 53, 627–640
September 15, 2020 © 2020 Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.003>



Article

Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis

Sophie Tran,^{1,7} Ines Baba,^{1,7} Lucie Poupel,¹ Sébastien Dussaud,¹ Martine Moreau,¹ Adélaïde Géliéneau,¹ Geneviève Marcelin,² Elissa Magréau-Davy,¹ Melissa Ouhachi,¹ Philippe Lesnik,¹ Alexandre Boissonnas,³ Wilfried Le Goff,¹ Björn E. Clausen,⁴ Laurent Yvan-Charvet,⁵ Florian Sennlaub,⁶ Thierry Huby,¹ and Emmanuel L. Gautier^{1,8,*}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, UMR_S 1166), Sorbonne Université, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, UMR_S 1269), Sorbonne Université, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, UMR1135), Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, ERL8255), Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses CIMI, Paris, France

⁴Institute for Molecular Medicine, University Medical Center of the Johannes Gutenberg-University Mainz, Mainz, Germany

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm, U1065), Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Atip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Oncoage, Nice, France

⁶Institut de la Vision, Sorbonne Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, France

⁷These authors contributed equally

⁸Lead Contact

*Correspondence: emmanuel-laurent.gautier@inserm.fr

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.003>

SUMMARY

Kupffer cells (KCs) are liver-resident macrophages that self-renew by proliferation in the adult independently from monocytes. However, how they are maintained during non-alcoholic steatohepatitis (NASH) remains ill defined. We found that a fraction of KCs derived from Ly-6C⁺ monocytes during NASH, underlying impaired KC self-renewal. Monocyte-derived KCs (MoKCs) gradually seeded the KC pool as disease progressed in a response to embryo-derived KC (EmKC) death. Those MoKCs were partly immature and exhibited a pro-inflammatory status compared to EmKCs. Yet, they engrafted the KC pool for the long term as they remained following disease regression while acquiring mature EmKC markers. While KCs as a whole favored hepatic triglyceride storage during NASH, EmKCs promoted it more efficiently than MoKCs, and the latter exacerbated liver damage, highlighting functional differences among KCs with different origins. Overall, our data reveal that KC homeostasis is impaired during NASH, altering the liver response to lipids, as well as KC ontogeny.

INTRODUCTION

Tissue-resident macrophages are essential to preserve tissue homeostasis (Wynn et al., 2013). Kupffer cells (KCs), the tissue-resident macrophages inhabiting the liver, are located in the hepatic sinusoids, where they sample both the portal and arterial blood circulation. The role of KCs in several aspects of the immune response (Jenne and Kubes, 2013), in particular the response to blood-borne pathogens (Surewaard et al., 2016; Zeng et al., 2016), is well appreciated, but many of their accessory functions remain to be uncovered.

KCs develop embryonically (Gomez Perdiguero et al., 2015; Hoeffel et al., 2015) and are maintained independently from circulating monocytes in the healthy adult, relying on local proliferation to self-renew and sustain in the long term. How-

ever, when depleted through high-dose irradiation (Beattie et al., 2016) or diphtheria toxin (DT)-mediated killing (Scott et al., 2016), embryo-derived KCs (EmKCs) are replaced by monocyte-derived KCs (MoKCs). In addition, KC-specific deletion of the transcription factors ZEB2 and LXR α , which are necessary for KC self-maintenance (Scott et al., 2018), equally lead to the generation of MoKCs filling up the empty niche. To date, whether KC maintenance is impaired during physiopathological processes is still poorly understood. Several pieces of evidence suggest that MoKCs are generated during *Listeria monocytogenes* infection (Blériot et al., 2015) or in mouse models where massive red blood cell lysis occurs (Theurl et al., 2016), but such MoKCs might not be maintained in the long term (Theurl et al., 2016). In addition, whether MoKCs are commonly observable in other



pathological states, especially in chronic liver diseases, remains elusive.

The most prominent form of liver disease in the Western world, affecting approximately one-third of the population (Hardy et al., 2016), is nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Its incidence keeps growing due to its close association with obesity, type 2 diabetes, and the metabolic syndrome (Hardy et al., 2016). NAFLD includes a spectrum of liver disorders ranging from nonalcoholic fatty liver (NAFL), more commonly termed steatosis, to nonalcoholic steatohepatitis (NASH). NASH, which is characterized by steatosis, inflammation, ballooning injury, and varying degrees of fibrosis (Hardy et al., 2016), represents the first critical stage of NAFLD. Macrophages are believed to be essential for controlling the inflammatory process during NASH (Krenkel and Tacke, 2017). Indeed, whole body monocyte and macrophage depletion attenuates the progression toward NASH in animal models (Huang et al., 2010; Reid et al., 2016). However, it is unclear whether those effects are attributable to inflammatory monocyte-derived macrophages (MoDMacs) or KCs. More generally, KC biology in NASH remains poorly investigated, especially due to the lack of validated strategies to discriminate, isolate, and therefore study KCs.

Here, we set out to determine whether KC self-renewal is disturbed in the context of NASH. Our findings reveal steatohepatitis has a major and long-lasting impact on KCs' ability to self-maintain that in turn alters the liver response to lipid overload.

RESULTS

CLEC2 Discriminates KCs from MoDMacs in NASH

In order to specifically distinguish KCs by flow cytometry, we looked for surface markers discriminating KCs from the inflammatory MoDMacs found in inflamed livers. We and others have previously reported considerable heterogeneity in the transcriptional profile among different tissue-resident macrophages (Gautier et al., 2012a; Lavin et al., 2014). Data mining of published tissue-resident macrophage transcriptome analysis (Gautier et al., 2012a; Lavin et al., 2014), including KCs, revealed several markers selectively expressed by KCs but not MoDMacs (Figures S1A and S1B). In particular, CLEC2 (encoded by *Clec1b*), CD207 (also known as Langerin), VSIG4 (also known as CR1g), and TIMD4 (also known as TIM-4) were either very selectively and/or strongly expressed by KCs. Flow cytometry analysis of KCs, defined as CD64⁺ F4/80^{hi} cells (Figure 1A), in the healthy liver revealed that they homogeneously expressed those markers, with particularly high expression of CLEC2 (Figure 1B). We also validated that all CLEC2^{hi} leukocytes in the naive liver were indeed KCs with their typical F4/80^{hi} expression profile (Figure 1C). We next asked whether CLEC2 would help to discriminate KCs from MoDMacs during NASH. We chose the model of methionine- and choline-deficient (MCD) diet-induced NASH, which recapitulates the ultrastructural changes observed in human patients (Machado et al., 2015), thus closely resembling human NASH histological features. MCD diet feeding of wild-type (WT) mice for 6 weeks induced liver dysfunction. This was characterized by increased plasma alanine aminotransferase (ALT) activity (Figure 1D) and elevated hepatic triglyceride (TG) content (Figure 1E), mostly as macrovesicular droplets into hepatocytes (Figure S1C), in MCD-fed animals. To discriminate

KCs from MoDMacs, we first gated on KCs defined as CD11b^{lo} CLEC2^{hi} cells (Figure 1F). Among the remaining cells, we identified CLEC2⁻ CD11b⁺ CD64⁺ MoDMacs that appeared upon MCD diet feeding (Figure 1F). Finally, Ly-6C⁺ CD11b⁺ monocytes and Ly-6C^{int} CD11b^{hi} neutrophils were identified in the CLEC2⁻ CD11b⁺ CD64⁻ fraction (Figure 1F). Then, we observed that KCs accumulated intracellular lipids upon MCD feeding (Figure 1G), while their proliferative status remained unchanged (Figure 1H). Intracellular lipid content in MoDMacs also increased in MCD-fed animals when they were compared to the scarce cells we found in that gate in chow-fed controls (Body MFI [mean fluorescence intensity] of 9,868 ± 944 in the MCD conditions versus 3,597 ± 1,048 in controls, *p* < 0.01), but it was markedly lower than in KCs. Overall, we found that KC numbers during NASH remained similar to the control condition, while MoDMacs and Ly-6C⁺ monocyte numbers, as well as neutrophils (data not shown), drastically increased (Figure 1I). Of note, we also evaluated the gating strategy presented above in pre-NASH models of steatosis such as *Ob/Ob* mice and high-fat diet (HFD)-fed mice and could confirm the coexistence of MoDMacs and KCs in these models (Figures S1D–S1I). Next, we challenged *Ccr2*^{-/-} mice, characterized by low circulating Ly-6C^{hi} monocytes, with the MCD diet in order to ascertain the monocytic origin of MoDMacs. As expected, liver Ly-6C^{hi} monocyte counts and MoDMac numbers were extremely low in *Ccr2*^{-/-} mice (Figures 1J and 1K). In addition to MoDMacs, we noticed that KC counts decreased by half in *Ccr2*^{-/-} animals (Figure 1K). Such decrease in KCs was not observed in condition of steatosis when *Ccr2*^{-/-} were challenged with an HFD (Figure S1I), suggesting NASH, but not steatosis, altered KC homeostasis. These observations suggest that, contrary to homeostasis, circulating monocytes contribute to the KC pool during NASH.

MoKCs Are Generated during NASH to Maintain the KC Pool

To establish the monocytic origin of KCs during NASH, we aimed to track Ly-6C^{hi} monocytes' fate. We thus developed bone marrow (BM) chimeras using CD45.2⁺ *Ccr2*^{-/-} recipients submitted to low-dose irradiation (3 Gy) and transplanted with 5–10 × 10⁶ BM cells from congenic CD45.1⁺ donors (Figure 2A). We reasoned that such a mild irradiation regimen would be sufficient to favor the engraftment of donor cells that will generate CCR2-sufficient monocytes able to enter the bloodstream, while it would spare radioresistant KCs. To validate our strategy, we determined the chimerism of circulating monocytes 2 weeks after transplantation and found that more than 80% of Ly-6C^{hi} and Ly-6C^{lo} monocytes were derived from CD45.1⁺ donor cells, as expected (Figures 2B and 2C). At this time point, approximately 30% of neutrophils and B cells, but less than 2% of T cells, were CD45.1⁺ (Figure 2C). Six weeks after transplantation, the chimerism observed in monocytes, neutrophils, and B cells was comparable to the 2-week time point (Figure 2D). Therefore, these chimeras should allow us to track the fate of monocytes during NASH by determining the fraction of CD45.1⁺ cells in our populations of interest.

These chimeras were put on a standard chow or MCD diet for 6 weeks, and hepatic macrophage subset chimerism was

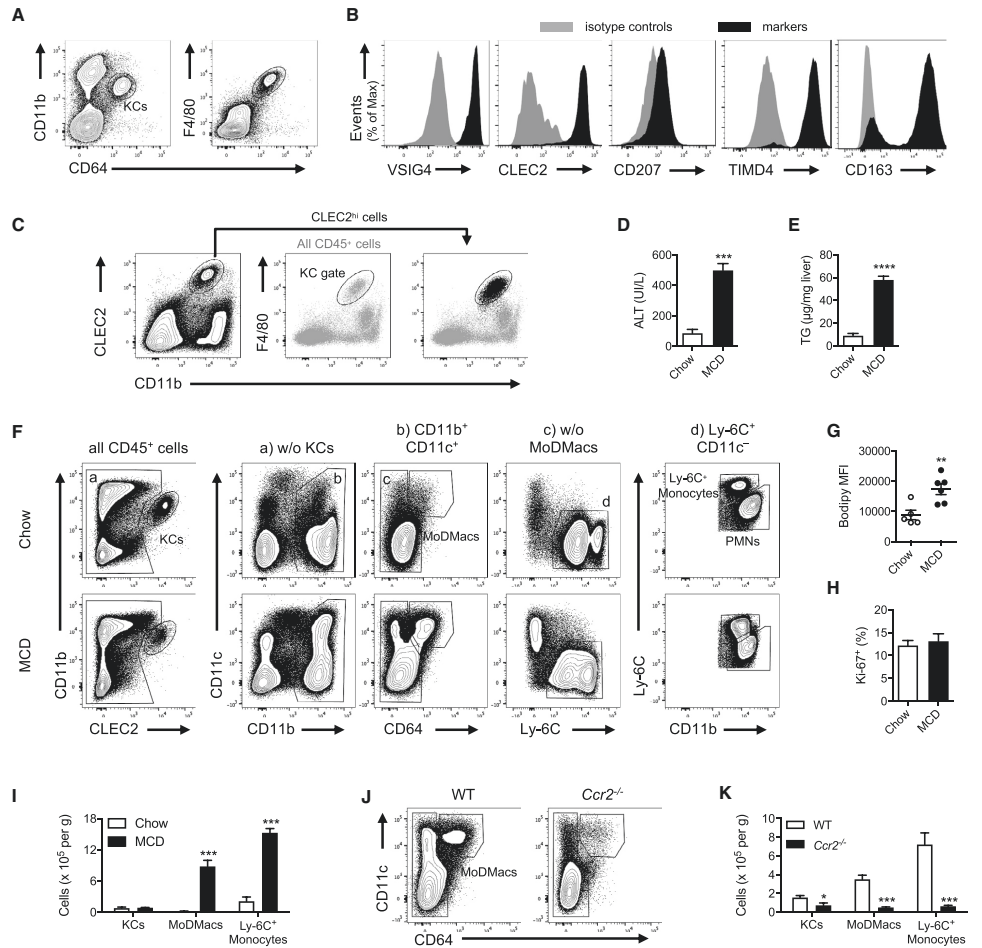


Figure 1. Discriminating Kupfer Cells from Inflammatory Monocyte-Derived Macrophages in a Mouse Model of NASH

(A) Flow cytometry analysis of CD64⁺ CD11b^{lo} KCs also all positive for F4/80.
 (B) Expression of cell surface markers VSIG4, CLEC2, CD207, TIMD4, and CD163 on CD64⁺ F4/80^{hi} KCs.
 (C) Liver CLEC2^{hi} cells are all bona fide CD11b^{lo} F4/80^{hi} KCs.
 (D and E) Plasma ALT (D) and liver TG content (E) in mice fed a chow or the MCD diet for 6 weeks (n = 4 per group).
 (F) Flow cytometry analysis of KCs (CLEC2^{hi} CD11b^{lo}), MoDMacs (CLEC2^{lo} CD11b^{hi} CD11c⁺ CD64⁺), Ly-6C⁺ monocytes (CLEC2^{lo} CD11b^{hi} CD64⁻ Ly-6C^{int} CD11b^{hi}), and neutrophils (CLEC2^{lo} CD11b^{hi} CD64⁻ Ly-6C^{int} CD11b^{hi}) in chow and MCD-fed animals.
 (G and H) Intracellular lipids stained by Bodipy (G) and percentage of Ki-67⁺ (H) KCs in mice fed a chow or the MCD diet for 6 weeks (n = 4–6 per group).
 (I) KC, MoDMac, and Ly-6C⁺ monocyte quantification in mice fed a chow or the MCD diet for 6 weeks (n = 4 per group).
 (J) Flow cytometry plots illustrating the loss of MoDMacs in *Ccr2*^{-/-} animals fed the MCD diet for 6 weeks as compared to controls.
 (K) KC, MoDMac, and Ly-6C⁺ monocyte quantification in WT and *Ccr2*^{-/-} mice fed a chow or the MCD diet for 6 weeks (n = 7–8 per group). Data are represented as mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.
 See also Figure S1.

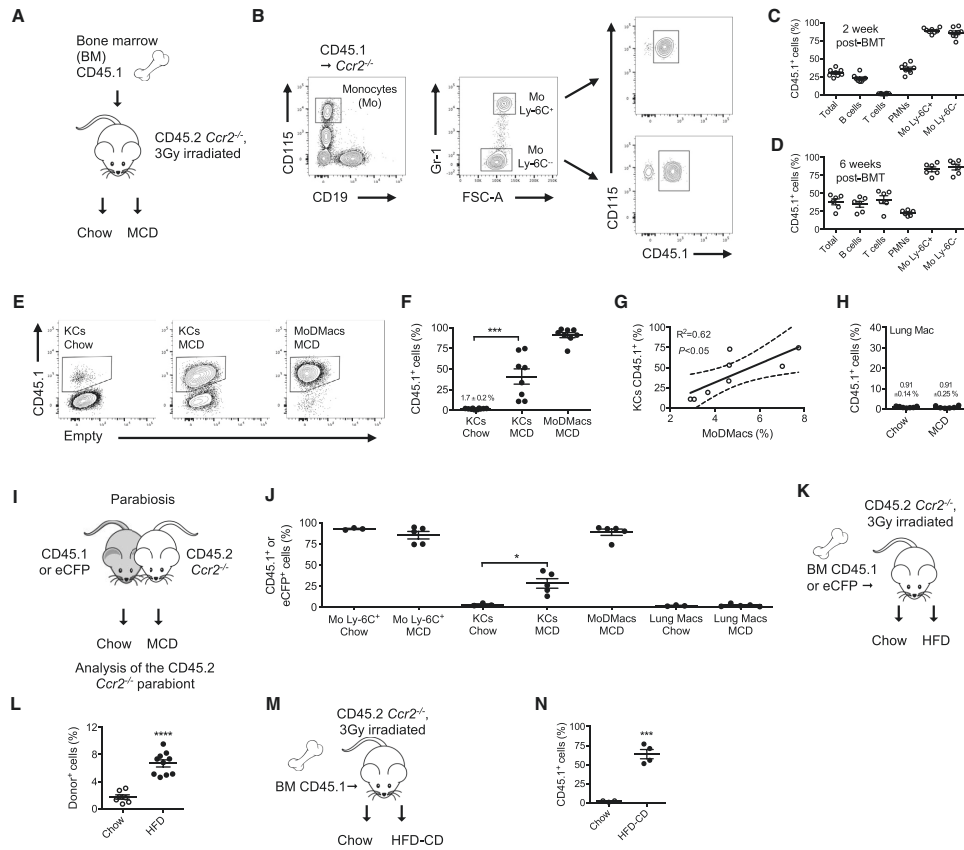


Figure 2. Monocyte-Derived KCs Contribute to the KC Pool during NASH

(A) Generation of low-irradiation chimeras using *Ccr2*^{-/-} mice as recipients and BM cells from CD45.1 mice.
 (B) Flow cytometry analysis of blood monocyte chimerism.
 (C and D) Chimerism in blood total leukocytes, T cells, B cells, polymorphonuclear neutrophils (PMNs), Ly-6C⁺ monocytes (Mo Ly-6C⁺) 2 weeks (C) or 6 weeks (D) after bone marrow transplantation (BMT) (n = 6–8).
 (E and F) Flow cytometry analysis (E) and quantification (F) of KC and MoDMac chimerism in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed a chow or the MCD diet for 6 weeks (n = 8–10).
 (G) Correlation between monocyte-derived KCs (KCs CD45.1⁺) and MoDMac frequencies in MCD-fed animals (n = 8).
 (H) Chimerism in lung alveolar macrophages of chow (n = 7) and MCD-fed *Ccr2*^{-/-}-based chimeras (n = 6).
 (I) Parabiosis-mediated pairing of WT CD45.1 or WT eCFP transgenic with *Ccr2*^{-/-} CD45.2 animals.
 (J) Chimerism (CD45.1⁺ or eCFP⁺ cells) in Ly-6C⁺ monocytes (Mo Ly-6C⁺), KCs, MoDMacs, and lung alveolar macrophages of the *Ccr2*^{-/-} parabionts in chow (n = 3) and MCD-fed animals (n = 5).
 (K and L) Strategy (K) and KC chimerism (L) in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed a chow (n = 7) or an HFD (n = 10) for 14 weeks.
 (M and N) Strategy (M) and KC chimerism (N) in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed a chow (n = 3) or a CDA-HFD (n = 4) for 4 weeks. Data are represented as mean ± SEM. *p < 0.05, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001. See also Figure S2.

assessed. As expected, a minor fraction of KCs (<2%) were CD45.1⁺ under chow diet, reflecting their radioresistance (Figures 2E and 2F). By contrast, almost all MoDMacs (>90% CD45.1⁺) were derived from monocytes (Figures 2E and 2F).

Next, in line with our findings above (Figure 1K), we observed that ~40% of KCs were CD45.1⁺ and thus derived from monocytes in the NASH condition (Figures 2E and 2F). The fraction of those MoKCs positively correlated with the abundance of

MoDMacs (Figure 2G), suggesting that increased inflammation favored MoKC generation. In addition, we evaluated whether the impact of the MCD diet was specific to KCs, and confirmed that monocytes did not contribute to the pool of radioresistant alveolar macrophages (Figure 2H). Similar conclusions were drawn when eCFP⁺ donor cells were used for the transplantation of irradiated *Ccr2*^{-/-} mice (Figures S2A–S2D). In addition, WT recipient mice submitted to low-dose irradiation and transplanted with CD45.1⁺ donor cells, which led to a chimerism of ~30% in Ly-6C⁺ monocytes, also harbored a fraction of their KCs that was derived from monocytes during NASH (Figures S2E and S2F). We next set out to validate the contribution of monocytes to the KC pool during NASH using an alternative approach. To this aim, we performed parabiosis experiments in which we joined CD45.2⁺ *Ccr2*^{-/-} with congenic CD45.1⁺ or eCFP transgenic mice (Figure 2I). Ly-6C⁺ monocytes in CD45.2⁺ *Ccr2*^{-/-} parabionts were derived to ~90% and ~85% from the CCR2-sufficient parabiont under chow and MCD diet, respectively (Figure 2J). Similar to our radiation chimeras, MoDMacs were exclusively derived from monocytes, while ~30% of KCs were monocyte derived in parabiotic mice with NASH (Figure 2J). Again, alveolar macrophages were maintained independently from monocytes during NASH (Figure 2J). To test whether MoKCs were generated during hepatic steatosis (NAFL), namely before NASH onset, *Ccr2*^{-/-}-based radiation chimeras were fed an HFD for 14 weeks (Figure 2K). This led to hepatic TG accumulation (~50 µg/mg of liver, data not shown), but no overt inflammation as revealed by the paucity of MoDMacs found in the liver under these conditions (Figure S1I). Still, NAFL triggered MoKC generation, as ~8% of KCs were CD45.1⁺ (Figure 2L), thus far less than what we observed during NASH. This result was in agreement with the observed correlation between MoKC and MoDMac abundance (Figure 2G), suggesting that NAFL did not create an inflammatory environment necessitating MoKC generation to maintain the KC pool. The similar KC numbers observed in *Ccr2*^{-/-} mice and their WT controls upon HFD feeding further supported this finding (Figure S1I). Finally, *Ccr2*^{-/-}-based chimeras were fed an HFD with low content of dietary choline (CDA-HFD) (Figure 2M), a model recently used as an alternative to the MCD diet (Wolf et al., 2014). Four weeks of CDA-HFD feeding induced massive hepatic TG accumulation (~200 µg/mg of liver, data not shown), and MoKC generation was extremely high in this context (Figure 2N). Overall, our findings suggest that the KC pool is unable to self-maintain during NASH, leading to the generation of MoKCs that sustain KC numbers.

MoKCs Are Maintained for Long Term after NASH Regression

We next looked more in depth into MoKC generation, characteristics, and long-term maintenance. Using *Ccr2*^{-/-}-based chimeras, we first noticed that the proportion of MoKCs among CLEC2⁺ KCs gradually increased during the progression of NASH (Figure 3A). Over the time course studied, monocyte chimerism was ~85%, meaning the real contribution of MoKCs to the KC pool reached 60% by 6 weeks of MCD feeding (Figure S2G). Next, to better characterize MoKCs, *Ccr2*^{-/-}-based chimeras generated as described above were fed a chow or the MCD diet. In order to evaluate the mRNA expression of the

classical KC markers (*Clec4f*, *Cd163*, and *Vsig4*), EmKCs were sorted from chow-fed healthy mice and EmKCs, MoKCs, and MoDMacs from mice with NASH. As expected, MoDMacs did not express these markers while EmKCs from healthy and NASH conditions similarly expressed *Clec4f*, *Cd163*, and *Vsig4* (Figure 3B). By contrast, MoKCs did not express these markers as compared to EmKCs (Figure 3B). In previous work, *Timd4* and *Cd163* mRNAs were shown to be almost absent on MoKCs generated following DT-mediated depletion of EmKCs in *Clec4f*-DTR mice, while *Vsig4* expression remained high (Scott et al., 2016). Here, we noticed *Vsig4* mRNA expression was lower in MoKCs compared to EmKCs (Figure 3B). *Clec4f* mRNA expression was also lower in MoKCs than EmKCs (Figure 3B). Notably, only a fraction of MoKCs (~40%) exhibited cell surface expression of VSIG4 (Figure 3C), and a similar observation was made for CLEC4F (Figure S2H). In a time-course experiment, we found that the fraction of VSIG4⁺ MoKCs remained around 40% over time, while EmKCs were homogeneously VSIG4⁺ (Figures S2I and 2J). Finally, the vast majority of MoKCs (~90%) were TIMD4⁻, as expected (Figure 3D). In addition, we also noticed that MoKCs were hyperproliferative as compared to EmKCs (Figure 3E). Thus, our findings suggest that while MoKCs generated during NASH express CLEC2 similarly to their EmKCs counterparts, they do not fully mature during disease progression.

Next, we examined whether MoKCs would mature and be maintained for the long term after NASH regression. To address this point, NASH was induced, and mice were then switched to a chow diet for 6 and 12 weeks. After 6 weeks of regression, plasma alanine aminotransferase (ALT) activity was already similar to healthy conditions (Figure 3F), and MoDMacs were no longer observed in the liver (data not shown). Concerning hepatic TG content, while it was already markedly decreased after 6 weeks, 12 weeks were needed to reach the levels observed in healthy animals (Figure 3G). After 6 weeks of regression, we found that MoKCs still represented ~40%–50% of the KC pool (Figure 3H), arguing that they do not represent a transient fate and can be maintained in the long term as EmKCs. At this time, MoKCs were almost all mature VSIG4⁺ cells as observed for EmKCs (Figure 3I), but only ~15% (16.6 ± 1.2%, n = 7) were TIMD4⁺. In addition, MoKCs lost their hyperproliferative state and proliferated at rates similar to EmKCs (Figure 3J). MoKC contribution to the KC pool was still effective after 12 weeks of regression (Figure 3K). They were nearly all VSIG4⁺, with ~20% of them (20.6 ± 2%, n = 8) expressing TIMD4, and their proliferative state was also comparable to EmKCs (Figure 3L).

Overall, our findings reveal that MoKCs generated over the course of NASH development are immature but could mature and be maintained in the long term when disease regresses. Thus, EmKCs can be replaced by MoKCs that acquire the potential to self-renew.

EmKC Protection from Cell Death Limits MoKC Generation

We next wondered whether increased EmKC death initiated MoKC development. We indeed found a marked increase in CLEC4F⁺ EmKC cell death during NASH as compared to healthy conditions (Figure 4A). To validate that EmKC demise led to

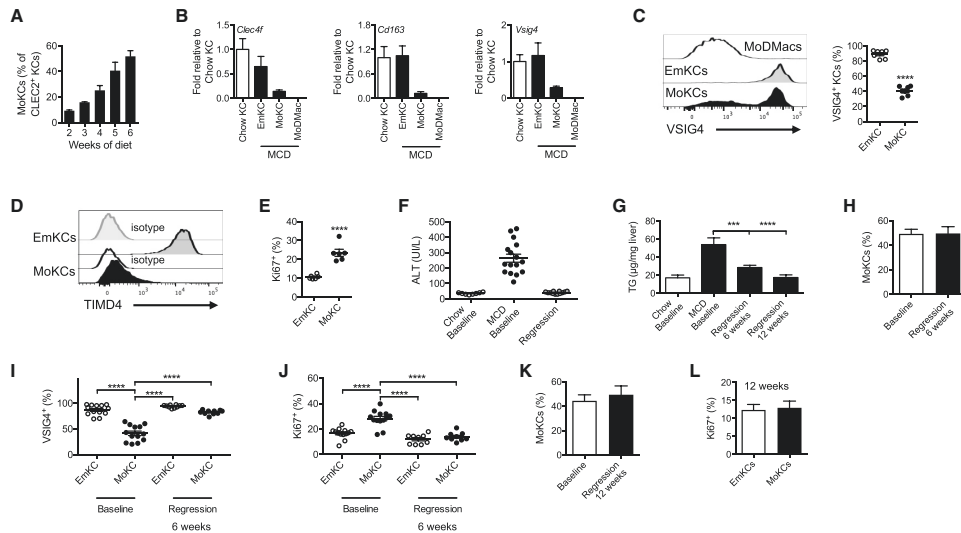


Figure 3. Monocyte-Derived KCs Mature and Maintain in the Long Term after NASH Regression

(A) MoKC frequency in CLEC2⁺ KCs in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed the MCD diet for 2 to 6 weeks (n = 3–6 per time point).
 (B) qPCR analysis of KC markers (*Clec4f*, *Cd163*, and *Vsig4*) in EmKCs (CD11b^{lo} CLEC2^{hi} CD45.1⁻) sorted from chow-fed animals (chow KC) (n = 4), as well as EmKCs (n = 5) and MoKCs (CD11b^{hi} CLEC2^{hi} CD45.1⁺, n = 6) sorted from mice fed the MCD diet for 6 weeks. MoDMacs from MCD-fed animals were also sorted and analyzed (n = 5).
 (C) Cell surface expression of Vsig4 on EmKCs, MoKCs, and MoDMacs in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed the MCD diet for 6 weeks (n = 7).
 (D) Cell surface expression of TIMD4 on EmKCs and MoKCs in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed the MCD diet for 6 weeks.
 (E) EmKC and MoKC proliferative status in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed the MCD diet for 6 weeks (n = 6).
 (F and G) Plasma ALT activity (F) and hepatic TG content (G) in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed chow (n = 4–8) or MCD diet (n = 9–16) for 6 weeks and *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed MCD diet for 6 weeks and then chow diet for another 6 (ALT and TG, n = 10–12) or 12 weeks (TG, n = 7) to induce NASH regression.
 (H) Frequency of MoKCs in the KC pool in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed MCD diet for 6 weeks (Baseline, n = 12) and *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed MCD diet for 6 weeks and then chow diet for another 6 weeks (regression, n = 8).
 (I and J) Frequency of EmKCs and MoKCs expressing Vsig4 (I) or Ki-67 (J) in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed MCD diet for 6 weeks (Baseline, n = 13) and *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed MCD diet for 6 weeks and then chow diet for another 6 weeks (regression, n = 9–10).
 (K) Frequency of MoKCs in the KC pool in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed MCD diet for 6 weeks (Baseline, n = 5) and *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed MCD diet for 6 weeks and then a chow diet for another 12 weeks (regression, n = 6).
 (L) EmKC and MoKC proliferation status in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed MCD diet for 6 weeks and then chow diet for another 12 weeks (n = 6). Data are represented as mean ± SEM. ***p < 0.001 and ****p < 0.0001.
 See also Figure S2.

MoKC generation, we decided to strengthen EmKC survival capacities. Therefore, we took advantage of transgenic mice overexpressing the human isoform of the death-protective factor BCL2 under control of the myeloid CD68 promoter (*Cd68-hBCL2* mice) (Gautier et al., 2009), which has increased EmKC numbers (Bouchareychas et al., 2015). To specifically modulate EmKC but not monocyte nor MoDMac death, *Cd68-hBCL2* animals were crossed to *Ccr2*^{-/-} mice, irradiated at 3 Gy and transplanted with CD45.1⁺ BM (Figure 4B). In this model, radioresistant EmKCs expressed hBCL2, while monocytes and MoDMacs did not, since they were almost all derived from donor CD45.1⁺ cells (Figure 4C). After 6 weeks of MCD diet feeding, blood Ly-6C⁺ monocyte chimerism was ~95% in *Ccr2*^{-/-} recipients and ~86% in *Cd68-hBCL2* x *Ccr2*^{-/-} recipients (data not shown). At this time point, liver Ly-6C⁺ monocyte chimerism was ~98% in *Ccr2*^{-/-} recipients and ~95% in *Cd68-*

hBCL2 x *Ccr2*^{-/-} recipients (data not shown). A 1.8-fold decrease in MoKC frequency was observed in male *Cd68-hBCL2* x *Ccr2*^{-/-} recipients (Figure 4D). Absolute MoKC numbers were also decreased, while EmKCs were increased in male *Cd68-hBCL2* x *Ccr2*^{-/-} recipients (Figure S2K). In females, MoKC frequency was decreased by 2.5-fold as compared to controls (Figure 4E), and this was also observed when absolute numbers were assessed (Figure S2L). In conclusion, forced expression of hBCL2 in EmKCs limits their replacement by MoKCs, indicating that EmKC death facilitates the generation of MoKCs.

EmKC Replacement by MoKCs Limits Hepatic TG Storage during NASH

To further study MoKC function, we sought for transgenic tools allowing their targeting. As reported previously, *Cd207* mRNA

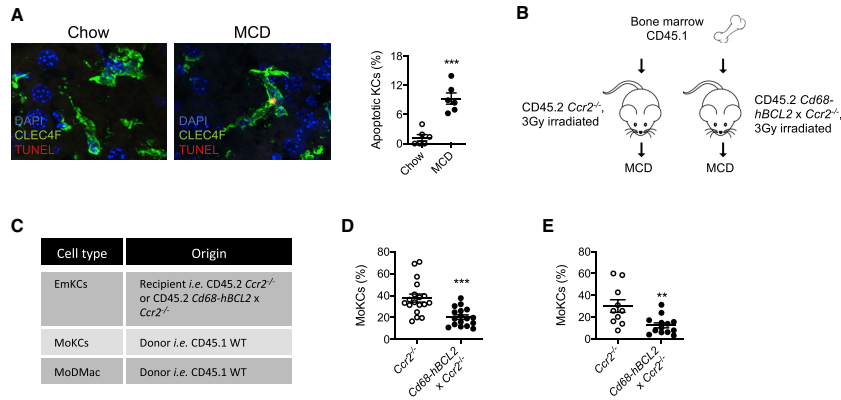
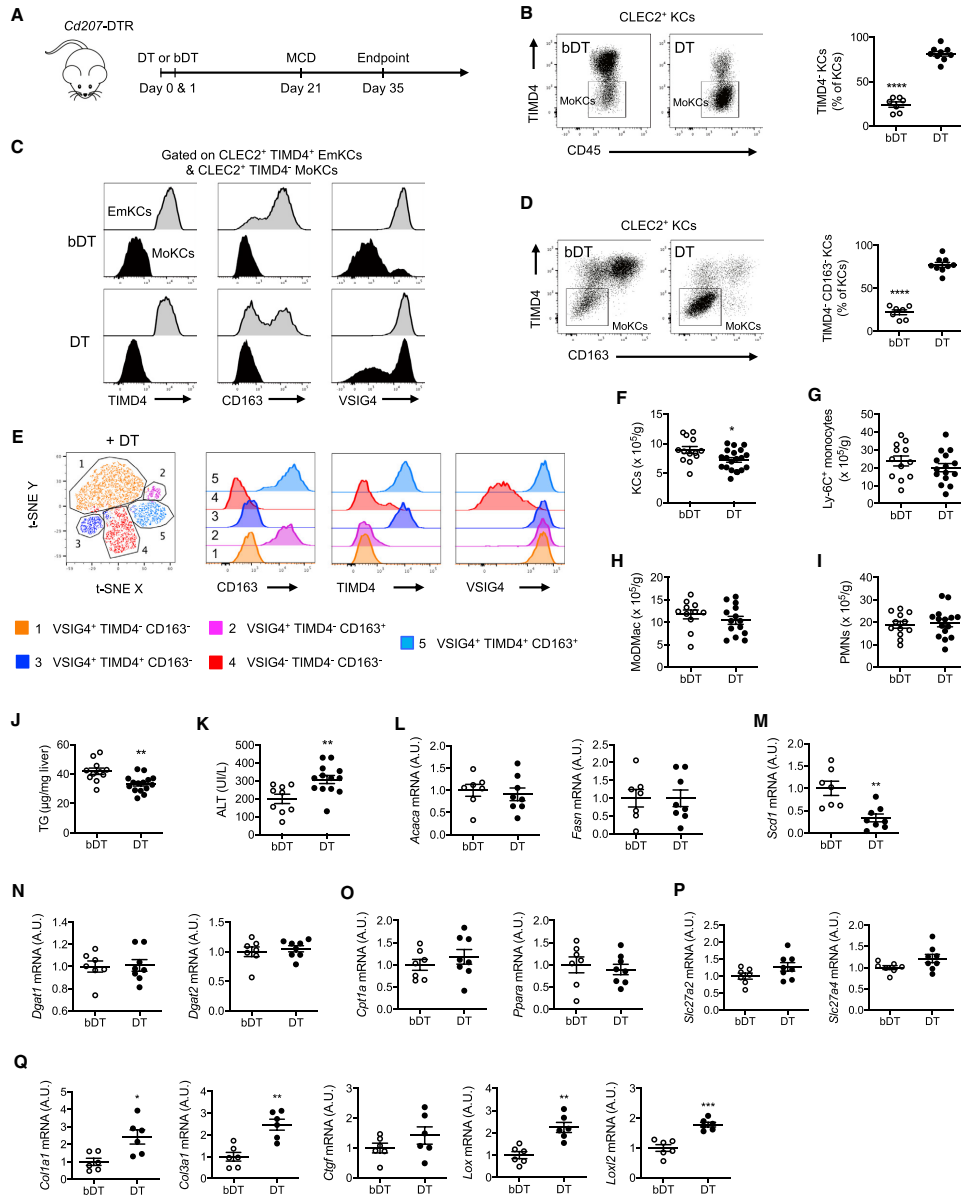


Figure 4. EmKC Protection from Cell Death Limits MoKC Generation
 (A) Detection and quantification of dying TUNEL⁺ CLEC4F⁺ EmKCs on frozen liver sections of chow and MCD-fed animals (n = 6 per condition).
 (B) Chimeras used to protect EmKCs from death.
 (C) Table recapitulating the origin and genotype of EmKCs, MoKCs, and MoDMacs in chimeras.
 (D and E) Frequency of MoKCs in male (D) (n = 17–18 per group) and female (E) (n = 10–13 per group) *Ccr2*^{-/-}- and *Cd68-hBCL2* x *Ccr2*^{-/-}-based chimeras after 6 weeks of MCD diet. Data are represented as mean ± SEM. **p < 0.01 and ***p < 0.001. See also Figure S2.

is expressed by KCs (Lavin et al., 2014), and we validated herein its expression at the protein level (Figure 1B). To achieve inducible KC depletion, we used *Cd207*-DTR mice, known to delete skin Langerhans cells as well as lung and spleen cDC1 dendritic cells (Kissenpfennig et al., 2005). When these mice were injected with DT, EmKCs were efficiently depleted while tissue-resident macrophages in other tissues (spleen, kidney, peritoneum, and lung) and blood monocytes remained unaffected (Figure S3A). Since we also detected *Cd207* mRNA expression in MoKCs but not MoDMacs (data not shown), we thought we could generate *Ccr2*^{-/-}-based chimeras using *Cd207*-DTR BM as donor cells to deplete MoKCs, while EmKCs and MoDMacs would remain intact. Unfortunately, DT injection was ineffective at fully depleting MoKCs in those chimeras (data not shown). Such a finding is reminiscent of what was recently observed in the KC-specific *Clec4f-cre* mouse strain, in which MoKCs were not able to induce cre recombinase expression as compared to EmKCs (Scott et al., 2018). To study whether MoKCs influence NASH development in a similar way as EmKCs, we generated mice harboring either EmKCs only or a majority of MoKCs. As DT-mediated depletion of EmKCs leads to their replacement by MoKCs (Scott et al., 2016), we used *Cd207*-DTR to generate mice bearing MoKCs following DT injection. They were compared to *Cd207*-DTR receiving boiled-inactivated DT (bDT), and thus harboring only EmKCs. As expected, MoKCs, defined as CLEC2⁺ TIMD4⁻ CD163⁻ cells, represented >80% of the KC pool in chow-fed *Cd207*-DTR mice 3 weeks after DT injection (Figure S3B). Moreover, total KC numbers were similar between bDT and DT-treated animals at this time point (Figure S3C). While DT also depleted CD8 α ⁺ and CD103⁺ cDC1 dendritic cells in the spleen and lung of *Cd207*-DTR mice (data not shown), they were back to normal 3 weeks after DT treatment

(Figures S3D and 3E). In addition, liver cDC1 appeared normal in *Cd207*-DTR mice 3 weeks after DT treatment (Figure S3F). Thus, at this time point, MoKCs have replaced EmKCs in DT-treated animals, and the other populations affected by DT were back to normal. Next, 3 weeks after being treated with DT or bDT, *Cd207*-DTR mice were fed the MCD diet for 2 weeks (Figure 5A). We chose this time point to limit the amount of engrafted MoKCs in the control bDT-treated animals (Figure 3A) and thus maximize the difference in MoKC numbers between the two groups. Here, we assumed that TIMD4⁺ KCs were all bona fide MoKCs based on our data (Figure 3D) and others previous findings (Beattie et al., 2016; Scott et al., 2018). Hence, we defined EmKCs as CLEC2⁺ TIMD4⁺ and MoKCs as CLEC2⁺ TIMD4⁻. Two weeks after MCD diet feeding, ~25% and more than 80% of KCs were TIMD4⁻ MoKCs in bDT- and DT-treated animals, respectively (Figure 5B). In bDT-treated controls, CLEC2⁺ TIMD4⁻ MoKCs were CD163⁻ and partly VSIG4⁺, while EmKCs were mostly CD163⁺ and all VSIG4⁺ (Figure 5C). In DT-treated animals, MoKCs were essentially CD163⁻, and a significant proportion were VSIG4⁺ (Figure 5C). Overall, lack of TIMD4 and CD163 expression ascertained the monocytic origin of KCs. After 2 weeks of MCD diet, TIMD4⁻ CD163⁻ MoKCs represented ~20% and ~80% in bDT- and DT-treated animals, respectively (Figure 5D). When a t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) analysis was conducted in order to perform a dimensional reduction of KC diversity in DT-treated animals, two TIMD4⁺ EmKC subsets (cluster 3: VSIG4⁺ TIMD4⁺ CD163⁻; cluster 5: VSIG4⁺ TIMD4⁺ CD163⁺) and three TIMD4⁻ MoKC subsets (cluster 1: VSIG4⁺ TIMD4⁻ CD163⁻; cluster 2: VSIG4⁺ TIMD4⁻ CD163⁺; cluster 4: VSIG4⁻ TIMD4⁻ CD163⁻) were identified (Figure 5E), most likely underlying several stages of maturation in MoKCs. All subsets included, we noticed a small



(legend on next page)

decrease in the total KC pool in DT-treated *Cd207*-DTR mice, suggesting that the ability of MoKCs to self-maintain during NASH was slightly limited as compared to EmKCs (Figure 5F). Yet, Ly-6C⁺ monocyte (Figure 5G), MoDMac (Figure 5H), and neutrophil (Figure 5I) counts were unaltered. Next, we determined whether the liver pathology was altered. We observed a decrease in hepatic TG storage in DT-treated *Cd207*-DTR mice (Figure 5J) while plasma ALT activity increased in these mice (Figure 5K). Thus, altered ability to store TGs and hepatic damage were observed when MoKCs dominate in the liver. Next, mRNA expression of key genes involved in lipid metabolism were assessed in the liver. We observed that genes involved in fatty acid synthesis (*Acaca* and *Fasn*) were unchanged (Figure 5L). By contrast, *Scd1*, which encodes for an enzyme catalyzing the conversion of toxic saturated fatty acids (SFAs) into monounsaturated fatty acids (MUFAs) that can eventually be stored as TGs, was decreased in DT-treated *Cd207*-DTR animals (Figure 5M). Of note, *Scd1*^{-/-} animals fed an MCD diet exhibit limited hepatic TG storage and increased liver damage (Li et al., 2009), as observed in our model. Genes involved in TG synthesis (*Dgat1* and *Dgat2*), lipid oxidation (*Cpt1a* and *Ppara*), and fatty acid uptake (*Slc27a2* and *Slc27a4*) were similarly expressed in DT-treated *Cd207*-DTR mice and controls (Figures 5N–5P). Finally, we analyzed the mRNA expression of genes involved in extracellular matrix deposition, even though the timeframe of our experimental set up was too short to observe hepatic fibrosis. Indeed, the MCD diet can induce liver fibrosis when administered to mice for months (Machado et al., 2015). We observed that several pro-fibrotic mediators were elevated in the liver of DT-treated *Cd207*-DTR mice as compared to controls (Figure 5Q). Overall, mice harboring a majority of MoKCs had decreased hepatic TG content, increased liver damage, and a pre-fibrotic gene signature after they were challenged with the MCD diet for 2 weeks.

To gain further insight into the potential functional differences between EmKCs and MoKCs, we sorted these two populations from livers of WT mice with NASH and performed RNA-seq analysis. EmKCs were also sorted from chow-fed animals. EmKCs and MoKCs were discriminated based on TIMD4 expression, as mentioned above. Comparative transcriptomic analysis revealed 4 clusters (Figure 6A). Cluster 1 discriminated EmKCs from MoKCs and included the classical EmKC markers *Cd163*, *Cxcl13*, and *Vsig4*. Cluster 2 comprised EmKC-specific genes

that were slightly downregulated under NASH conditions. Overall, these two clusters were enriched with genes involved in the complement and coagulation cascades. EmKC homeostasis was definitely altered upon MCD diet feeding, as we noticed the induction of inflammatory genes as well as genes involved in endoplasmic reticulum (ER) stress (Figures S4A–S4C), which might explain why EmKCs die during NASH (Figure 4A). Such signature was not observed in EmKCs from HFD-fed animals (Figures S4A–S4C). Next, genes mutually induced in EmKCs and MoKCs during NASH composed cluster 3 and were enriched for pathways such as cytokine-cytokine receptor interaction and the lipid pathway “PPAR signaling.” Overall, few differences between EmKCs and MoKCs were noted regarding the expression of genes involved in lipid metabolism (Figures S4D–S4F), except a decrease in *Scd1* mRNA expression in MoKCs (Figure S4F). This observation was consistent with the decreased cellular lipid staining observed in MoKCs, as SCD-1 favors lipid storage (Figure S4G). Of note, MoKC lipid loading might thus be an intermediate between MoDMacs and EmKCs. Finally, cluster 4 comprised genes strongly enriched in MoKCs, and most of these genes were involved in inflammatory processes. Indeed, pathways as cytokine-cytokine receptor interaction, chemokine signaling, NF- κ B signaling, or TNF signaling were enriched in this last cluster. Such inflammatory status of MoKCs might have favored the onset of the pre-fibrotic signature we observed in the liver of mice harboring a majority of MoKCs (Figure 5Q). In addition, we noticed that several genes encoding for known pro-fibrotic mediators (*Vegfa*, *Spp1*, *Inhba*, *Osm*, *Lgals3*, *Il10*, and *Fn1*) were upregulated in MoKCs as compared to EmKCs (Figure S4H). Overall, a principal component analysis revealed that EmKCs from the NASH condition clearly clustered aside from naive EmKCs, while MoKCs were definitely set apart (Figure 6B). Then, we observed that many genes known as EmKC markers, such as *Clec4f* and *Timd4*, were downregulated in EmKCs during NASH, and weakly expressed by MoKCs (Figure 6C). Also, the expression of genes associated with iron metabolism suggested that MoKCs were less actively engaged in erythrophagocytosis, a key EmKC function (Figure S4I). By contrast, *Cx3cr1* and *Ccr2* were solely found in MoKCs, indicating their monocytic origin (Figure 6C). A contamination of MoKCs by liver capsular macrophages (LCMs) that also express *Cx3cr1* (Sierro et al., 2017) was excluded since *Clec1b* (encoding CLEC2) mRNA expression

Figure 5. EmKC Replacement by MoKCs Limited Hepatic TG Storage during NASH

(A) Strategy used to generate mice bearing mostly EmKCs or MoKCs.

(B) Flow cytometry analysis and quantification of TIMD4⁺ KC (MoKC) frequency among KCs after 2 weeks of MCD diet in *Cd207*-DTR animals previously injected with bDT (n = 7) or DT (n = 9).

(C) Flow cytometry analysis of TIMD4, CD163, and VSIG4 expression on EmKCs and MoKCs after 2 weeks of MCD diet in *Cd207*-DTR animals previously injected with bDT or DT.

(D) Flow cytometry analysis and quantification of TIMD4⁺ CD163⁺ MoKC frequency after 2 weeks of MCD diet in *Cd207*-DTR animals previously injected with bDT (n = 7) or DT (n = 9).

(E) tSNE analysis of KC diversity based on TIMD4, CD163, and VSIG4 expressions after 2 weeks of MCD diet in *Cd207*-DTR animals that were previously injected with active DT. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) histograms highlight the expression of TIMD4, CD163, and VSIG4 in the different clusters identified. (F–K) Liver KC (F), Ly-6C⁺ monocyte (G), MoDMac (H), and neutrophil (PMNs) (I) numbers, as well as hepatic TG content (J) and plasma ALT activity (K) after 2 weeks of MCD diet in *Cd207*-DTR animals previously injected with bDT (n = 9–13) or DT (n = 13–20).

(L–Q) Hepatic mRNA expression of *Acaca* and *Fasn* (L), *Scd1* (M), *Dgat1* and *Dgat2* (N), *Cpt1a* and *Ppara* (O), *Slc27a2* and *Slc27a4* (P), as well as *Col1a1*, *Col3a1*, *Ctgf*, *Lox*, and *Loxl2* (Q) were measured after 2 weeks of MCD diet in *Cd207*-DTR animals previously injected with bDT (n = 6–7) or DT (n = 6–8). Data are represented as mean \pm SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

See also Figure S3.

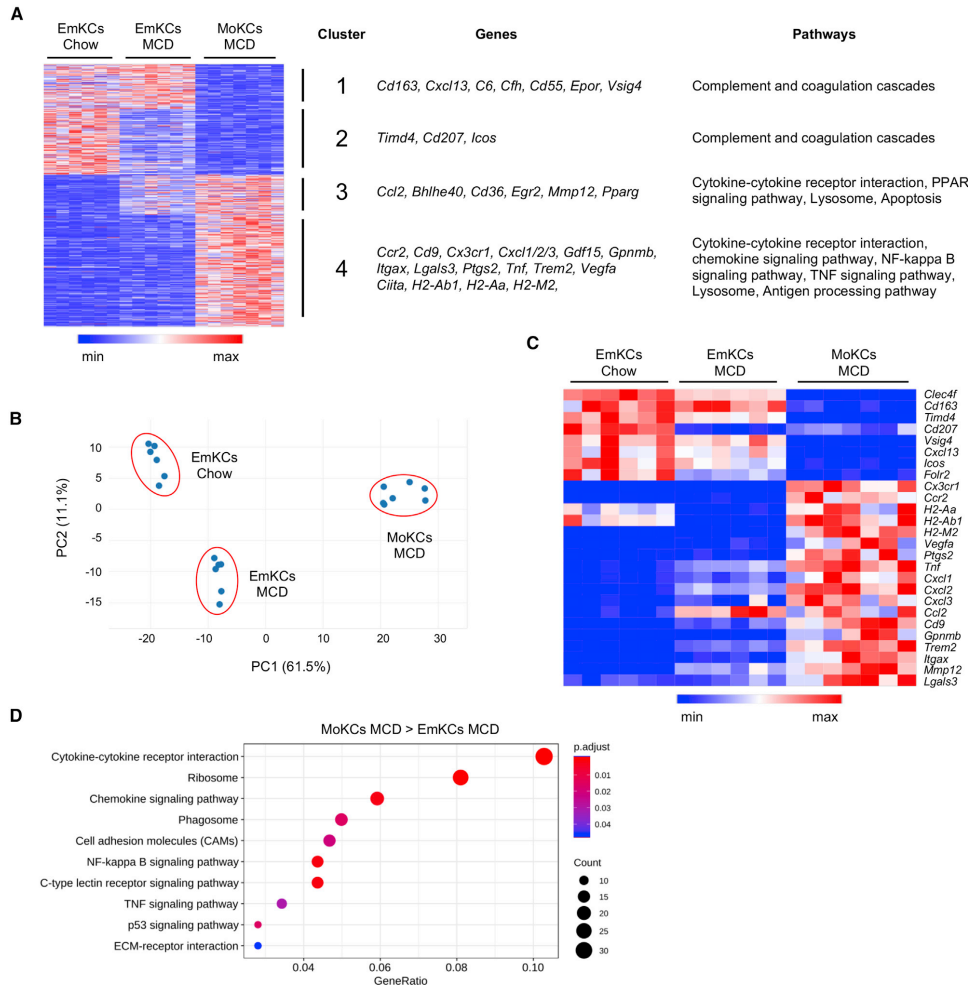


Figure 6. Transcriptional Profiling of KC Subsets

A. K-means clustering analysis of KC subsets found in control and NASH conditions revealed four clusters. Representative genes, as well as pathways enriched in those clusters, were depicted.

(B) Principal-component analysis (PCA) of EmKCs retrieved from chow-fed animals (n = 6), as well as EmKCs (n = 6) and MoKCs (n = 7) isolated from mice fed MCD diet for 6 weeks.

(C) Heatmap of keys genes discriminating EmKCs from MoKCs.

(D) Pathways enriched in MoKCs compared to EmKCs during NASH.

See also Figures S4, S5, and S6.

was low in LCMs as observed for *Clec4f*, *Vsig4*, *Cd163*, and *Timd4* (Figure S5A). Furthermore, KC subset expression of GFP in *Cx3cr1^{Gfp/+}* mice fed the MCD for 6 weeks revealed that CX3CR1 promoter activity was absent in EmKCs and only observed in the most immature VSIG4-negative MoKCs (Figure S5B). Inflammatory genes (*Tnf*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, and *Ccl2*) were induced in EmKCs during NASH, and were even more strongly expressed in MoKCs. Additionally, genes associated with the metabolic activation of macrophages such as *Cd9*, *Trem2*, and *Gpmb* (Jaitin et al., 2019) were markedly induced

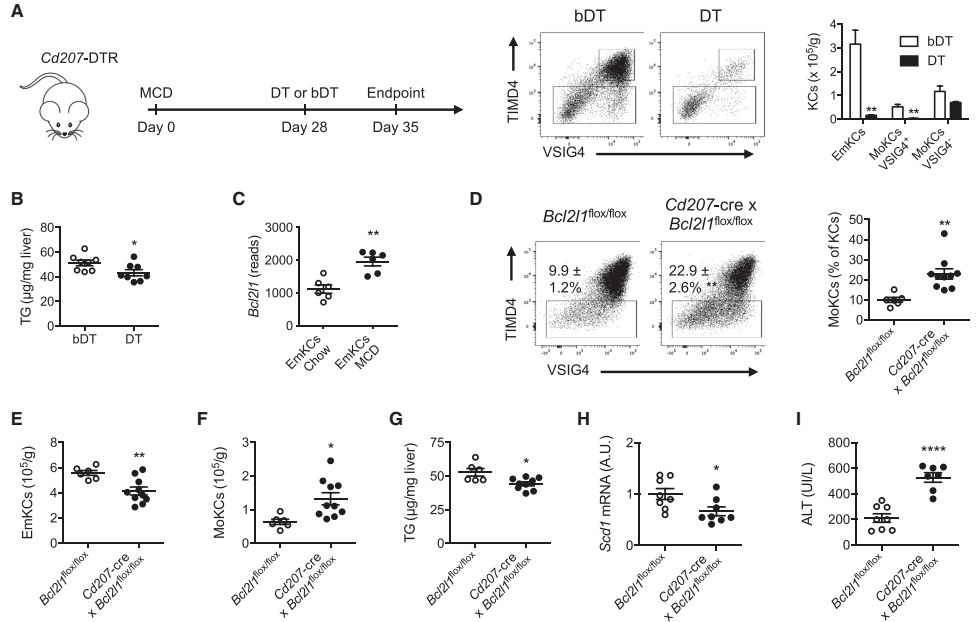


Figure 7. Modulation of KC Subsets and Its Impact on NASH

(A) Strategy used to deplete KCs in mice with established NASH and flow cytometry analysis of EmKCs (TIMD4⁺ VSIG4⁺), “mature” MoKCs (TIMD4⁺ VSIG4⁺), and “immature” MoKCs (TIMD4⁺ VSIG4⁻) 24 h after *Cd207*-DTR animals with established steatohepatitis were injected with bDT (n = 3) or DT (n = 3). The bar graph shows KC subset quantification.

(B) Hepatic TG content 1 week after *Cd207*-DTR animals with established steatohepatitis were injected with bDT (n = 8) or DT (n = 8).

(C) RNA-seq data of *Bcl2l1* mRNA expression in EmKCs under chow (n = 6) and MCD-fed conditions (n = 6).

(D) Flow cytometry analysis and quantification of MoKCs in animals lacking the anti-apoptotic gene *Bcl2l1* in EmKCs (*Cd207*-cre x *Bcl2l1*^{flox/flox} mice, n = 10) fed the MCD diet for 2 weeks as compared to controls (*Bcl2l1*^{flox/flox} mice, n = 6).

(E and F) Absolute quantification of EmKCs (E) and MoKCs (F) in *Cd207*-cre x *Bcl2l1*^{flox/flox} mice (n = 10) and *Bcl2l1*^{flox/flox} controls (n = 6) fed the MCD diet for 2 weeks.

(G) Hepatic TG content in *Cd207*-cre x *Bcl2l1*^{flox/flox} mice (n = 9) and *Bcl2l1*^{flox/flox} control (n = 6) fed the MCD diet for 2 weeks.

(H) *Scd1* mRNA expression in the liver of *Cd207*-cre x *Bcl2l1*^{flox/flox} mice (n = 8) and *Bcl2l1*^{flox/flox} controls (n = 8) fed the MCD diet for 2 weeks.

(I) Plasma ALT activity in *Cd207*-cre x *Bcl2l1*^{flox/flox} mice (n = 7) and *Bcl2l1*^{flox/flox} controls (n = 8) fed the MCD diet for 2 weeks. Data are represented as mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, and ****p < 0.0001. See also Figure S7.

in MoKCs (Figure 6C). Overall, when compared to EmKCs retrieved from the NASH condition, MoKCs were enriched with genes related to inflammatory pathways (Figure 6D). Next, we intended to further document differences between EmKCs and MoKCs using our RNA-seq data. In particular, we wondered how the inflammatory hepatic environment, partly driven by lipids such as SFAs, would impact on KC subsets. SFAs are known inducers of inflammation that engage the NLRP3 inflammasome, and we found several components of this complex were upregulated in MoKCs as compared to EmKCs (Figure S6A). Then, we generated gene signatures characterizing the macrophage response to SFA alone or in combination with LPS, and we found they were significantly enriched in MoKCs versus EmKCs (Figures S6B and S6C). This suggests MoKCs were probably more prone to lipid-induced stress and inflamma-

tion during NASH. In summary, MoKCs have a distinct transcriptional landscape characterized by an increased inflammatory status, and they altered the liver response to lipids during NASH as compared to EmKCs.

Impaired EmKC Survival and Accelerated MoKC Generation Limit Hepatic TG Content during NASH

We next addressed how EmKCs would impact hepatic TG storage during NASH progression. To this aim, *Cd207*-DTR mice were fed the MCD diet for 4 weeks and then injected with bDT or DT. One day after DT injection, we found that EmKCs, as well as “mature” VSIG4⁺ MoKCs, were depleted, while VSIG4⁻ MoKCs were unaffected (Figure 7A). Depletion of these subsets led to decreased hepatic TG storage as measured 1 week after bDT or DT injection (Figure 7B). Thus, KCs as a whole facilitate

hepatic TG storage, although MoKCs were less efficient to do so than EmKCs. We next set out to identify regulators of EmKC survival whose deletion would accelerate their replacement by MoKCs. Our RNA-seq analysis revealed that the anti-apoptotic gene *Bcl2l1* was expressed by EmKCs, and its expression increased during NASH (Figure 7C). Thus, to determine whether *Bcl2l1* expression by EmKCs would be a brake to MoKC generation, we deleted *Bcl2l1* in EmKCs by crossing *Bcl2l1* floxed animals to *Cd207-cre* mice (Zahner et al., 2011). In the steady state, mice lacking *Bcl2l1* in KCs showed a decrease in EmKCs and harbored few MoKCs (Figures S7A and 7B). These mice and their controls were then fed with the MCD diet for 2 weeks. After challenge, mice lacking *Bcl2l1* in EmKCs displayed an increase in the MoKC fraction among KCs (Figure 7D). Eventually, EmKC numbers were decreased (Figure 7E), while MoKC numbers increased (Figure 7F) in *Cd207-cre x Bcl2l1^{fllox/fllox}* mice as compared to controls. These changes were associated with decreased TG storage in the livers of *Cd207-cre x Bcl2l1^{fllox/fllox}* animals (Figure 7G), concomitant to lower hepatic *Scd1* mRNA expression (Figure 7H). Finally, plasma ALT activity was markedly elevated in *Cd207-cre x Bcl2l1^{fllox/fllox}* animals as compared to controls (Figure 7I). Thus, limiting EmKC survival and favoring the generation of MoKCs ultimately impacts on hepatic lipid content and liver damage during NASH.

DISCUSSION

Under homeostatic conditions, KCs are known to self-renew locally to maintain themselves in the long term, independently from circulating monocytes. Whether this paradigm holds true during pathological settings remains unclear. While it has been shown that KCs from monocytic origin are generated upon *Listeria monocytogenes* infection (Blériot et al., 2015), acetaminophen-induced liver injury does not drive MoKC development (Zigmond et al., 2014). Thus, MoKC generation during acute inflammatory episodes is not a consistently observed event. In addition, the impact of chronic liver diseases on KC self-maintenance remains ill-defined. Here, we asked whether metabolic liver alterations such as hepatic steatosis and its progression to NASH, the leading cause of chronic hepatopathy worldwide, would affect KC homeostasis. We now report that steatohepatitis alters the ability of KCs to self-maintain, leading to the generation of MoKCs seeding the liver in the long term, even after disease has regressed. Thus, chronic steatohepatitis leads to permanent changes in the KC pool, with potential long-lasting impact on liver homeostasis and function.

Studying KC homeostasis first necessitated to unequivocally discriminate them from MoDMacs accumulating during steatohepatitis. Initially, we used markers such as VSIG4, TIMD4, and CD163 previously known for their selective expression on KCs, but not MoDMacs. However, we found that CLEC2 was the most useful marker to selectively identify KCs. In fact, CLEC2 cell surface expression was similar on EmKCs and MoKCs. Of note, there is still more to learn about CLEC2 regulation, as it is not well documented, although it doesn't seem to be regulated on EmKCs during liver injury (Zigmond et al., 2014). By contrast, TIMD4 and CD163 were poorly expressed by MoKCs, while VSIG4 and CLEC4F were only present on a fraction of these cells. Also, *Clec1b* (encoding CLEC2) mRNA induction

by MoKCs preceded *Vsig4*, *Clec4f*, *Cd163*, and *Timd4* expression in a model of experimental KC depletion (Bonnardel et al., 2019), implying that CLEC2 is one of the earliest markers signing the acquisition of a KC identity. CLEC2 also permitted us to discriminate MoKCs from MoDMacs. Several KC markers were induced in MoKCs, but not in MoDMacs, arguing that MoKCs mostly differ from MoDMacs by their ability to integrate cues from the niche and transition toward a KC fate. Further work will be needed to develop the tools to image CLEC2⁺ cells and document MoKCs' and EmKCs' respective locations along the hepatic sinusoids. Thus, CLEC2 was instrumental to unequivocally identify KCs independently from their origin. A recent study identified two KC subsets in the human liver based on TIMD4 expression, suggesting KC diversity might also be observed in human liver diseases (Ramachandran et al., 2019).

Here, we revealed that steatohepatitis profoundly affected KC homeostasis, and their potential to self-renew was insufficient to maintain the KC pool under those chronic inflammatory conditions. Monocyte differentiation into KCs was thus necessary to maintain KC numbers similar to those observed under homeostatic conditions. We observed more EmKC death during NASH that favored the appearance of MoKCs. Multiple aspects of NASH pathogenesis, such as lipid-induced ER stress and oxidative stress, may concur to cause KC death, as they lead to hepatocytes apoptosis (Kanda et al., 2018). We indeed observed a gene signature consistent with increased ER stress in EmKCs during NASH, which may underly their increased susceptibility to die.

MoKCs were generated in the course of steatohepatitis, and we observed that they still contributed to the KC pool after disease had regressed. While a majority of MoKCs found during NASH were not fully mature, MoKCs were maintained and matured after NASH regression. Their contribution to the KC pool remained stable even 3 months after disease regression. MoKCs thus acquired the full spectrum of KC characteristics and, in particular, the ability to self-renew, although we did not rule out that continuous MoKC generation occurred during NASH regression. These findings are conflicting with a recent report claiming that the changes observed within the liver macrophage pool during MCD diet-induced NASH were transient (Devisscher et al., 2017). In this study, macrophages were defined as F4/80⁺ Ly-6C^{lo} cells, and the macrophage pool was further subdivided into three populations, namely CLEC4F⁺ TIMD4⁺, CLEC4F⁺ TIMD4⁻, and CLEC4F⁻ TIMD4⁻ cells. During disease regression, the two latter populations were lost, and only a few TIMD4⁻ macrophages were left after regression. Monocyte tracking was not performed in this study, which might explain the discrepancy. In our study, following monocyte fate turned out to be crucial because the cell surface phenotype of MoKCs changed as they matured during regression. Overall, MoKCs were capable to seed the liver and to maintain in the long term. These findings revealed that the ability of monocytes to fill the niche after KC death, as happens after experimental KC depletion (Scott et al., 2016), can similarly be observed in certain physiopathological contexts such as NASH.

In order to compare KC subsets impact on NASH development, we generated mice harboring mostly MoKCs or only EmKCs. We noticed from our RNA-seq analysis that MoKCs were enriched for genes involved in cellular stress and activation,

which would need to be further substantiated at the protein level. Then, we observed that MoKCs limited hepatic TG storage upon MCD diet feeding while increasing liver damage as assessed by plasma alanine aminotransferase activity. Such decreased steatosis most likely reflected limited storage into hepatocytes rather than KCs, given that hepatocytes occupy a much larger volume and store TGs as macrovesicular lipid droplets as compared to microvesicular droplets in KCs. Finally, we found that liver expression of *Scd1*, encoding for an enzyme that limits the accumulation of toxic lipids and favors TG storage, was decreased when MoKCs dominated. Further work would be needed to address its specific regulation in hepatocytes. It is noteworthy that the phenotype of *Scd1*^{-/-} animals fed the MCD diet mirrored our observations, with limited liver TG storage and increased hepatic damage (Li et al., 2009). *Scd1*^{-/-} animals had increased SFA to MUFA ratio and were impaired in their ability to partition excess lipid into MUFAs that can be safely stored (Li et al., 2009). Of note, the slight decrease in MoKC numbers observed after MCD feeding could also have contributed in reducing TG accumulation in our model. In addition, we observed a decrease in hepatic TG storage when we specifically depleted EmKCs and VSIG4⁺ MoKCs in established NASH. Finally, we revealed that limiting EmKC survival and favoring their replacement by MoKCs dampened hepatic TG content and increased liver damage. We can thus assign an accessory function to EmKCs as facilitators of hepatic lipid storage as TGs, an adaptation to lipid overload that limits lipid toxicity and confers tissue protection. Nonetheless, our results revealed that MoKCs might not be as effective as EmKCs in promoting this lipid storage. This finding highlights a differential functional impact of KCs on liver disease depending on their origin.

Overall, our work revealed that steatohepatitis had a major and long-lasting impact on the ability of EmKCs to self-maintain, which in turn impacted on the liver response to lipid overload.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **RESOURCE AVAILABILITY**
 - Lead Contact
 - Materials Availability
 - Data and Code Availability
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
 - Mouse strains used in the study
 - Animal housing and diets used
- **METHOD DETAILS**
 - Total body irradiation and bone marrow transplantation
 - Parabiosis
 - Diphtheria toxin (DT) injection in *Cd207*-DTR mice
 - Plasma alanine aminotransferase activity
 - Liver lipid extraction and triglycerides determination
 - Tissue processing and cell suspensions preparation
 - Flow cytometry
 - Liver neutral lipid staining and *in situ* analysis of Kupffer cells death
 - qPCR analysis of flow cytometry-sorted cells

- qPCR analysis of liver samples
- Published RNaseq and microarray datasets
- RNaseq on flow cytometry-sorted KCs
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.003>.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to E.L.G. from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0015-02, ANR-17-CE14-0009-02, and ANR-17-CE14-0023-01) and from the city of Paris (Emergence(s) program). S.T. and M.O. both received a one-year doctoral fellowship from the Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.T., I.B., S.D., M.M., A.G., and M.O. designed and performed experiments and analyzed data. L.P. designed and performed experiments, analyzed data, and provided intellectual input. G.M. provided mice and intellectual input and edited the manuscript. P.L. provided mice. A.B. provided mice and technical expertise. W.L.G. provided mice. L.Y.-C. and F.S. provided intellectual input and edited the manuscript. B.E.C. provided mice and edited the manuscript. T.H. provided intellectual input, provided mice, designed experiments, interpreted data, and edited the manuscript. E.L.G. conceptualized and supervised the study, designed and performed experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: November 29, 2019

Revised: April 14, 2020

Accepted: May 29, 2020

Published: June 19, 2020

REFERENCES

- Beattie, L., Sawtell, A., Mann, J., Frame, T.C.M., Teal, B., de Labastida Rivera, F., Brown, N., Walwyn-Brown, K., Moore, J.W.J., MacDonald, S., et al. (2016). Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. *J. Hepatol.* **65**, 758–768.
- Blériot, C., Dupuis, T., Jouvion, G., Eberl, G., Disson, O., and Lecuit, M. (2015). Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* **42**, 145–158.
- Bonnardel, J., T'Jonck, W., Gaublomme, D., Browaeys, R., Scott, C.L., Martens, L., Vanneste, B., De Prijck, S., Nedospasov, S.A., Kremer, A., et al. (2019). Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity* **51**, 638–654.e9.
- Bouchareychas, L., Pirault, J., Saint-Charles, F., Deswaerte, V., Le Roy, T., Jessup, W., Giral, P., Le Goff, W., Huby, T., Gautier, E.L., and Lesnik, P. (2015). Promoting macrophage survival delays progression of pre-existing atherosclerotic lesions through macrophage-derived apoE. *Cardiovasc. Res.* **108**, 111–123.
- Devisscher, L., Scott, C.L., Lefere, S., Raevens, S., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., Geerts, A., Guillems, M., and Van Vierberghe, H. (2017). Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool. *Cell. Immunol.* **322**, 74–83.
- Gautier, E.L., Huby, T., Witztum, J.L., Ouzilleau, B., Miller, E.R., Saint-Charles, F., Aucouturier, P., Chapman, M.J., and Lesnik, P. (2009). Macrophage



- apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation* 119, 1795–1804.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012a). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 13, 1118–1128.
- Gautier, E.L., Chow, A., Spanbroek, R., Marcelin, G., Greter, M., Jakubzick, C., Bogunovic, M., Leboeuf, M., van Rooijen, N., Habenicht, A.J., et al. (2012b). Systemic analysis of PPAR γ in mouse macrophage populations reveals marked diversity in expression with critical roles in resolution of inflammation and airway immunity. *J. Immunol.* 189, 2614–2624.
- Gautier, E.L., Ivanov, S., Lesnik, P., and Randolph, G.J. (2013). Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood* 122, 2714–2722.
- Gomez Perdiguer, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., and Rodewald, H.R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.
- Hardy, T., Oakley, F., Anstee, Q.M., and Day, C.P. (2016). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annu. Rev. Pathol.* 11, 451–496.
- Hoefel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., et al. (2015). C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* 42, 665–678.
- Huang, W., Mettakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J.J., Scott, D.K., and O'Doherty, R.M. (2010). Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59, 347–357.
- Jaitin, D.A., Adlung, L., Thaiss, C.A., Weiner, A., Li, B., Descamps, H., Lundgren, P., Blieriot, C., Liu, Z., Deczkowska, A., et al. (2019). Lipid-Associated Macrophages Control Metabolic Homeostasis in a Trem2-Dependent Manner. *Cell* 178, 686–698.e14.
- Jenne, C.N., and Kubes, P. (2013). Immune surveillance by the liver. *Nat. Immunol.* 14, 996–1006.
- Jourden, L., Bernard, M., Dillies, M.-A., and Le Crom, S. (2012). Eoulsan: a cloud computing-based framework facilitating high throughput sequencing analyses. *Bioinformatics* 28, 1542–1543.
- Kanda, T., Matsuoka, S., Yamazaki, M., Shibata, T., Nirei, K., Takahashi, H., Kaneko, T., Fujisawa, M., Higuchi, T., Nakamura, H., et al. (2018). Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 24, 2661–2672.
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., et al. (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22, 643–654.
- Krenkel, O., and Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 306–321.
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* 159, 1312–1326.
- Li, Z.Z., Berk, M., McIntyre, T.M., and Feldstein, A.E. (2009). Hepatic lipid partitioning and liver damage in nonalcoholic fatty liver disease: role of stearyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.* 284, 5637–5644.
- Machado, M.V., Michelotti, G.A., Xie, G., Almeida Pereira, T., Boursier, J., Bohnic, B., Guy, C.D., and Diehl, A.M. (2015). Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS ONE* 10, e0127991.
- Morgantini, C., Jager, J., Li, X., Levi, L., Azzimato, V., Sulen, A., Barreby, E., Xu, C., Tencerova, M., Näslund, E., et al. (2019). Liver macrophages regulate systemic metabolism through non-inflammatory factors. *Nat. Metab.* 1, 445–459.
- Ramachandran, P., Dobie, R., Wilson-Kanamori, J.R., Dora, E.F., Henderson, B.E.P., Luu, N.T., Portman, J.R., Matchett, K.P., Brice, M., Marwick, J.A., et al. (2019). Resolving the fibrotic niche of human liver cirrhosis at single-cell level. *Nature* 575, 512–518.
- Reid, D.T., Reyes, J.L., McDonald, B.A., Vo, T., Reimer, R.A., and Eksteen, B. (2016). Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. *PLoS ONE* 11, e0159524.
- Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., et al. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat. Commun.* 7, 10321.
- Scott, C.L., T'Jonck, W., Martens, L., Todorov, H., Sichien, D., Soen, B., Bonnardel, J., De Prijck, S., Vandamme, N., Cannoodt, R., et al. (2018). The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity* 49, 312–325.e5.
- Sierro, F., Evrard, M., Rizzetto, S., Melino, M., Mitchell, A.J., Florido, M., Beattie, L., Walters, S.B., Tay, S.S., Lu, B., et al. (2017). A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intra-peritoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment. *Immunity* 47, 374–388.e6.
- Surewaard, B.G.J., Deniset, J.F., Zemp, F.J., Amrein, M., Otto, M., Conly, J., Omri, A., Yates, R.M., and Kubes, P. (2016). Identification and treatment of the *Staphylococcus aureus* reservoir in vivo. *J. Exp. Med.* 213, 1141–1151.
- Theurl, I., Hilgendorf, I., Nairz, M., Tymoszyk, P., Haschka, D., Asshoff, M., He, S., Gerhardt, L.M.S., Holderried, T.A.W., Seifert, M., et al. (2016). On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat. Med.* 22, 945–951.
- Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohleber, D., 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, 549–564.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.
- Zahner, S.P., Kel, J.M., Martina, C.A.E., Brouwers-Haspels, I., van Rooij, M.A., and Clausen, B.E. (2011). Conditional deletion of TGF- β R1 using Langerin-Cre mice results in Langerhans cell deficiency and reduced contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 187, 5069–5076.
- Zeng, Z., Surewaard, B.G.J., Wong, C.H.Y., Geoghegan, J.A., Jenne, C.N., and Kubes, P. (2016). cRlg Functions as a Macrophage Pattern Recognition Receptor to Directly Bind and Capture Blood-Borne Gram-Positive Bacteria. *Cell Host Microbe* 20, 99–106.
- Zigmond, E., Samia-Grinberg, S., Pasmanik-Chor, M., Brazowski, E., Shibolet, O., Halpern, Z., and Varol, C. (2014). Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J. Immunol.* 193, 344–353.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
PE anti-mouse CD115 (AFS98)	BioLegend	Cat# 135506, RRID: AB_1937253
Alexa 647 anti-mouse CD115 (AFS98)	BioLegend	Cat# 135530, RRID: AB_2566525
FITC anti-mouse CD11c (N418)	BioLegend	Cat# 117306, RRID: AB_313775
PE/Cy7 anti-mouse CD11c (N418)	BioLegend	Cat# 117318, RRID: AB_493568
BV510 anti-mouse CD11c (N418)	BioLegend	Cat# 117353, RRID: AB_2686978
FITC anti-mouse MHC-II IA/IE (M5/114.15.2)	BioLegend	Cat# 107606, RRID: AB_313321
APC/Fire750 anti-mouse MHC-II IA/IE (M5/114.15.2)	BioLegend	Cat# 107652, RRID: AB_2616729
eFluor450 anti-mouse/human CD11b (M1/70)	ThermoFisher Scientific	Cat# 48-0112-82, RRID: AB_1582236
FITC anti-mouse/human CD11b (M1/70)	BioLegend	Cat# 101206, RRID: AB_312789
APC/Fire750 anti-mouse CD45 (30F11)	BioLegend	Cat# 103154, RRID: AB_2572116
BV510 anti-mouse CD45 (30F11)	BioLegend	Cat# 103138, RRID: AB_2563061
PerCP/Cy5.5 anti-mouse Ly6G/Ly-6C (Gr-1) (RB6-8C5)	BioLegend	Cat# 108428, RRID: AB_893558
FITC anti-mouse Ly-6C (HK1.4)	BioLegend	Cat# 128006, RRID: AB_1186135
PerCP/Cy5.5 anti-mouse Ly-6C (HK1.4)	BioLegend	Cat# 128012, RRID: AB_1659241
APC anti-mouse Ly-6C (HK1.4)	BioLegend	Cat# 128016, RRID: AB_1732076
PE anti-mouse CD64 (X54-5/7.1)	R&D Systems	Cat# FAB20741P, RRID: AB_2293958
Alexa 647 anti-mouse CD64 (X54-5/7.1)	BD Biosciences	Cat# 558539, RRID: AB_647120
PE anti-mouse CLEC2 (17D9)	BioLegend	Cat# 146104, RRID: AB_2562383
FITC anti-mouse CLEC2 (17D9)	Bio-Rad Laboratories	Cat# MCA5700F, RRID: AB_11152598
PE/Cy7 anti-mouse V5IG4 (NLA14)	ThermoFisher Scientific	Cat# 25-5752-82, RRID: AB_2637431
PE anti-mouse/human CD207 (4C7)	BioLegend	Cat# 144203, RRID: AB_2561498
APC anti-mouse/human CD207 (4C7)	BioLegend	Cat# 144205, RRID: AB_2561997
PE anti-mouse CD163 (TNKUPJ)	ThermoFisher Scientific	Cat# 12-1631-80, RRID: AB_2716923
FITC anti-mouse F4/80 (BM8)	BioLegend	Cat# 123108, RRID: AB_893502
Alexa 647 anti-mouse TIMD4 (RMT4-54)	BioLegend	Cat# 130008, RRID: AB_2271648
Alexa 700 anti-human/mouse Ki67 (B56)	BD Biosciences	Cat# 561277, RRID: AB_10611571
eFluor450 anti-mouse CD45.1 (A20)	ThermoFisher Scientific	Cat# 48-0453-82, RRID: AB_1272189
V450 anti-mouse CD19 (1D3)	BD Biosciences	Cat# 560375, RRID: AB_1645269
APC anti-mouse TCRb (H57-597)	ThermoFisher Scientific	Cat# 17-5961-81, RRID: AB_469480
PE anti-mouse CD103 (2E7)	BioLegend	Cat# 121406, RRID: AB_1133989
APC anti-mouse CD103 (2E7)	BioLegend	Cat# 121414, RRID: AB_1227502
PE anti-mouse Siglec-F (E50-2440)	BD Biosciences	Cat# 552126, RRID: AB_394341
PE anti-mouse CD8a (53-6.7)	BioLegend	Cat# 100708, RRID: AB_312747
Unconjugated anti-mouse CLEC4F	R&D Systems	Cat# AF2784, RRID: AB_2081339
Cy2 anti-goat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	Cat# 705-225-147, RRID: AB_2307341
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Collagenase D from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich	Cat# 11088882001
Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Sigma-Aldrich	Cat# DN25
Diphtheria Toxin from Corynebacterium diphtheriae	Merck Millipore	Cat# 322326
Diphtheria Toxin from Corynebacterium diphtheriae	Sigma-Aldrich	Cat# D0564
Draq7 Cell viability dye	BioLegend	Cat# 424001
Polysciences Carboxylate Microspheres 10.00µm	Polysciences	Cat# 18133-2

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Critical Commercial Assays		
ALAT (GPT) FS	DiaSys Diagnostic Systems	Cat# 127019910021
Triglycerides FS	DiaSys Diagnostic Systems	Cat# 157609910021
Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	ThermoFisher Scientific	Cat# 00-5523-00
BD Cytfix/Cytoperm (Fixation/Permeabilization Solution Kit)	BD Biosciences	Cat# 554714
RNeasy Plus Micro Kit	QIAGEN	Cat# 74034
SuperScript VILO cDNA synthesis kit	ThermoFisher Scientific	Cat# 11754050
SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing	Takara Bio	Cat# 634889
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Sigma-Aldrich	Cat# 12156792910
Deposited Data		
Microarray and RNaseq datasets	NCBI GEO DataSets	GSE37448, GSE15907, GSE63340, GSE75225, GSE55606, GSE77104, GSE117115.
Microarray dataset	ArrayExpress	E-MTAB-5932
RNaseq dataset	NCBI BioProject	PRJNA483744
RNaseq dataset	This paper	GSE138778
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6J	Janvier Labs, France	Cat# C57BL/6J
Mouse: B6.SJL- <i>Ptprc</i> ^a / <i>Pepc</i> ^b /BoyCr1 (CD45.1)	Charles River, France	Cat# CRL:494, RRID:IMSR_CRL:494
Mouse: B6.129(CFR)-Tg(CAG-EICFP)CK6Nagy/J (eCFP transgenic mice)	Jackson Laboratories, USA	Cat# JAX:004218, RRID:IMSR_JAX:004218
Mouse: B6.Cg- <i>Lep</i> ^{ob} /J (Ob/Ob mice)	Jackson Laboratories, USA	Cat# JAX:000632, RRID:IMSR_JAX:000632
Mouse: B6.129S4- <i>Ccr2</i> ^{tm1flc} /J (<i>Ccr2</i> -/- mice)	Jackson Laboratories, USA	Cat# JAX:004999, RRID:IMSR_JAX:004999
Mouse: Cd68-hBCL2	Our lab	N/A
Mouse: B6.129S2- <i>Cd207</i> ^{tm3(DTR/GFP)Maj} /J (<i>Cd207</i> -DTR mice)	Jackson Laboratories, USA	Cat# JAX:016940, RRID:IMSR_JAX:016940
Mouse: B6.129P2(Cg)- <i>Cx3cr1</i> ^{tm1Ltr} /J	Jackson Laboratories, USA	Cat# JAX:005582, RRID:IMSR_JAX:005582
Mouse: <i>Bcl2</i> 1 floxed animals	Edmund B. Rucker	N/A
Mouse: <i>Cd207</i> -cre mice	Björn E. Clausen	N/A
Software and Algorithms		
FlowJo	Treestar	RRID:SCR_008520
GraphPad Prism	GraphPad Software	RRID:SCR_002798
R Project for Statistical Computing	http://www.r-project.org/	RRID:SCR_001905
Euolsan	http://transcriptome.ens.fr/euolsan/	RRID:SCR_011901
STAR	https://github.com/alexdobin/STAR	RRID:SCR_015899
DESeq2	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html	RRID:SCR_015687
LIMMA		RRID:SCR_010943
Phantasus	https://artyomovlab.wustl.edu/phantasus/	
ClusterProfiler	http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html	RRID:SCR_016884
Enrichr	http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/	RRID:SCR_001575
Fiji	http://fiji.sc	RRID:SCR_002285

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Other		
BD LSRFortessa Cell Analyzer	Becton Dickinson	N/A
BD FACSAria II Cell Sorter	Becton Dickinson	N/A
Precellys	Bertin Instruments	N/A
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec	N/A
NovaSeq 6000	Illumina	N/A
Zeiss AxioImagerM2	Zeiss	N/A
Roche LightCycler 480	Roche Life Science	N/A

RESOURCE AVAILABILITY**Lead Contact**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Emmanuel Gautier (emmanuel-laurent.gautier@inserm.fr).

Materials Availability

This study did not generate new unique reagents.

Data and Code Availability

The accession number for the RNAseq data generated in this study was deposited under the accession number GSE138778.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**Mouse strains used in the study**

Wild-type C57BL/6J mice were from Janvier Labs. CD45.1 (Ly5.1, B6.SJL-*Ptprca^aPepec^b*/BoyCr1) and *Ob/Ob* (B6.Cg-*Lep^{ob}*/J) mice were from Charles River. *Ccr2^{-/-}* (B6.129S4-*Ccr2^{tm1lfrc}*/J), homozygous *eCFP* transgenic (B6.129((CR)-Tg(CAG-ECFP)CK6Nagy/J), hemizygous *Cx3cr1^{Gfp/+}* (B6.129P2(Cg)-*Cx3cr1^{tm1Llt}*/J) and homozygous *Cd207-DTR* (B6.129S2-*Cd207^{tm3(DTR/GFP)Mal}*/J) mice were from the Jackson Laboratory. *Cd68-hBCL2* mice previously generated by our team (Gautier et al., 2009) were bred in-house to *Ccr2^{-/-}* animals. Floxed *Bcl2l1* animals (provided by Edmund B. Rucker) were bred to *Cd207-cre* mice (Zahner et al., 2011) to obtain *Cd207-cre x Bcl2l1^{fllox/fllox}* animals.

Animal housing and diets used

Mice were maintained on a 12 h light and dark cycle with *ad libitum* access to water and standard chow diet (no. 5058; Lab-Diet). For steatohepatitis studies, animals were fed a methionine and choline-deficient diet (MCD, A02082002BR, Research Diets) or a choline-deficient high fat diet (CDA-HFD, A06071302, Research Diets). Alternatively, steatosis was induced by high fat diet feeding (HFD, D12492, Research Diets). Diet duration was indicated in the text and/or figure legends.

All animal procedures were in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the European Commission Directive 86/609/EEC and given authorization from the French Ministry of Research.

METHOD DETAILS**Total body irradiation and bone marrow transplantation**

Ccr2^{-/-} mice were exposed to 3Gy total body irradiation. Bone marrow cells were harvested from donor mice by gently flushing their femurs and 5 to 10 × 10⁶ cells were intravenously injected into each recipient mice. A two weeks-recovery period was observed to ensure donor bone marrow engraftment and blood monocytes reconstitution.

Parabiosis

Parabiotic mice were generated using 6 to 8 weeks old weight-matched CD45.2⁺ (C57BL/6J or *Ccr2^{-/-}*) and CD45.1⁺ (C57BL/6) female mice. One month after surgery mice were fed the MCD diet for 6 weeks.

Diphtheria toxin (DT) injection in *Cd207-DTR* mice

Kupffer cells were depleted following intraperitoneal DT injection (1 μg per mouse) in homozygous *Cd207-DTR* mice. When long-term experiments were conducted, two DT injections were performed one day apart in order to maximize EmKCs depletion and their replacement by MoKCs. *Cd207-DTR* mice injected with boiled, heat-inactivated DT (bDT) were used as controls.



Plasma alanine aminotransferase activity

Plasma alanine aminotransferase (ALT) activity was determined using a UV test kit (ALAT GPT FS, Diasys) run on a Konelab analyzer (Thermo Fisher Scientific).

Liver lipid extraction and triglycerides determination

Frozen liver samples (~50 mg) were homogenized in a chloroform/methanol mixture (3:2; 1 mL per 50 mg of tissue) using a tissue homogenizer (Precellys, Bertin Technologies) and lipids were extracted overnight. After centrifugation (20 min x 2200 rpm) at 4°C, an aliquot of the extract was combined (1:1) with 1% Triton in chloroform. After drying, a commercially available kit (Diasys) was used for colorimetric quantification of triglycerides.

Tissue processing and cell suspensions preparation

Spleens, lungs and kidneys were harvested from PBS-perfused animals and digested in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, no calcium and magnesium) containing fetal bovine serum (3%) and collagenase D (2.5 mg/mL, Sigma) as previously described (Gautier et al., 2012b). Circulating leukocytes preparation and peritoneal lavage were performed as previously described (Gautier et al., 2013). Livers were collected from mice perfused with PBS, placed in 3 mL of HBSS containing collagenase D (2.5 mg/mL, Sigma) and DNase (10 U/mL, Sigma), minced with scissors, run on the GentleMACS dissociator and incubated for 30 min at 37°C under agitation. Samples were then run on the GentleMACS dissociator for a second time. Cell suspensions were passed through a 100 µm filter before staining.

Flow cytometry

Antibodies were purchased from BioLegend, Thermo Fisher Scientific, R&D Systems and BD Biosciences. The following markers and clones were used: CD115 (AFS98), CD11c (N418), MHC-II (M5/114.15.2), CD11b (M1/70), CD45 (30-F11), Gr-1 (RB6-8C5), Ly-6C (HK1.4), CD64 (X54-5/7.1), CD64 (FAB20741P), VSIG4 (NLA14), CD207 (4C7), CLEC4F (AF2784), CD163 (TNKUPJ), F4/80 (BM8), TIMD4 (RMT4-54), CLEC2 (17D9), Ki-67 (B56), CD45.1 (A20), CD19 (1D3), TCRβ (H57-597), CD103 (2E7), Siglec-F (E50-2440) and CD8a (53-6.7).

Cell suspensions were stained with appropriate antibodies for 30 min on ice. Draq7 was used to exclude dead cells. Intracellular Ki-67 staining was performed using the Foxp3 staining kit from Thermo Fisher Scientific. Bodipy staining was performed on cells fixed using the Cytofix/Cytoperm™ kit from BD Biosciences.

To calculate absolute cell counts, a fixed number of nonfluorescent beads (10000, 10-µm polybead carboxylate microspheres from Polysciences) was added to each tube. The formula number of cells = (number of acquired cells × 10,000) ÷ (number of acquired beads) was used. Cell counts were finally expressed as a number of cells per milligram of tissue or per milliliter of blood.

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. Cell sorting was performed on a BD FACSAria II cell sorter.

Liver neutral lipid staining and *in situ* analysis of Kupffer cells death

Livers were collected, fixed in 4% paraformaldehyde solution followed by incubation in a sucrose solution (30% in PBS) at 4°C. Livers were then embedded in Tissue-Tek OCT compound and sectioned. Frozen sections (8 µm) were rinsed in PBS and incubated with Bodipy (0.1mg/mL in PBS) for 30 min to label neutral lipids. After washing in PBS, the sections were counterstained for nuclei with DAPI.

Frozen liver sections (8 µm) were rinsed in PBS and dead cells were labeled using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (TMR red, Sigma). Kupffer cells were labeled with an anti-CLEC4F antibody (goat polyclonal, R&D Systems) following by anti-goat Cy2 (Jackson ImmunoResearch) while nuclei were stained with DAPI.

Images were captured using a Zeiss AxioImagerM2 microscope and the AxioVision Zeiss software. Images were processed using the open-source Fiji software.

qPCR analysis of flow cytometry-sorted cells

Total RNA preparation was performed from 20 000 sorted 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 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 *Hprt*, *Rpl13a*, and *Nono*. Gene expression was normalized to those 3 housekeeping genes using the Roche LightCycler® 480 software. Primers sequences are available upon request.

qPCR analysis of liver samples

Total RNA preparation was performed using the NucleoSpin RNA Plus kit (MACHEREY-NAGEL). RNA was reverse transcribed using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Quantitative PCR analyses were performed using a LightCycler® 480 real-time PCR system and dedicated software (Roche). Gene expression was normalized to at least 3 housekeeping genes using the Roche LightCycler® 480 software. Primers sequences are available upon request.

Published RNaseq and microarray datasets

Expression of several genes was extracted from previous profiling of tissue resident macrophage populations (GSE37448, GSE15907, GSE63340, GSE75225, GSE55606, E-MTAB-5932, PRJNA483744) (Gautier et al., 2012a; Lavin et al., 2014; Morgantini et al., 2019). Other datasets were used (GSE77104, GSE117115) to generate specific gene signatures.

RNaseq on flow cytometry-sorted KCs

Total RNA preparation was performed from 5×10^3 sorted KCs using the RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN). cDNA libraries were generated using SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing (Takara). RNA-Seq libraries were sequenced on an Illumina NovaSeq 6000 (30 million reads per sample).

RNA-Seq analysis was completed using the Eoulsan pipeline (Jourden et al., 2012). 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 2-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. Principal component analysis, K-means clustering and GSEA analysis were performed using the Phantasus web platform. Cluster number was determined using the R cluster package. The R package ClusterProfiler and the web platform Enrichr were used for pathway analysis and illustration. Data were deposited at NCBI under the accession number GSE138778.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

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. When more than 2 groups were studied, analysis of variance was performed followed by Newman-Keuls as post hoc test. Graphs depicted the mean \pm SEM. Statistical significance is represented as follows: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001.

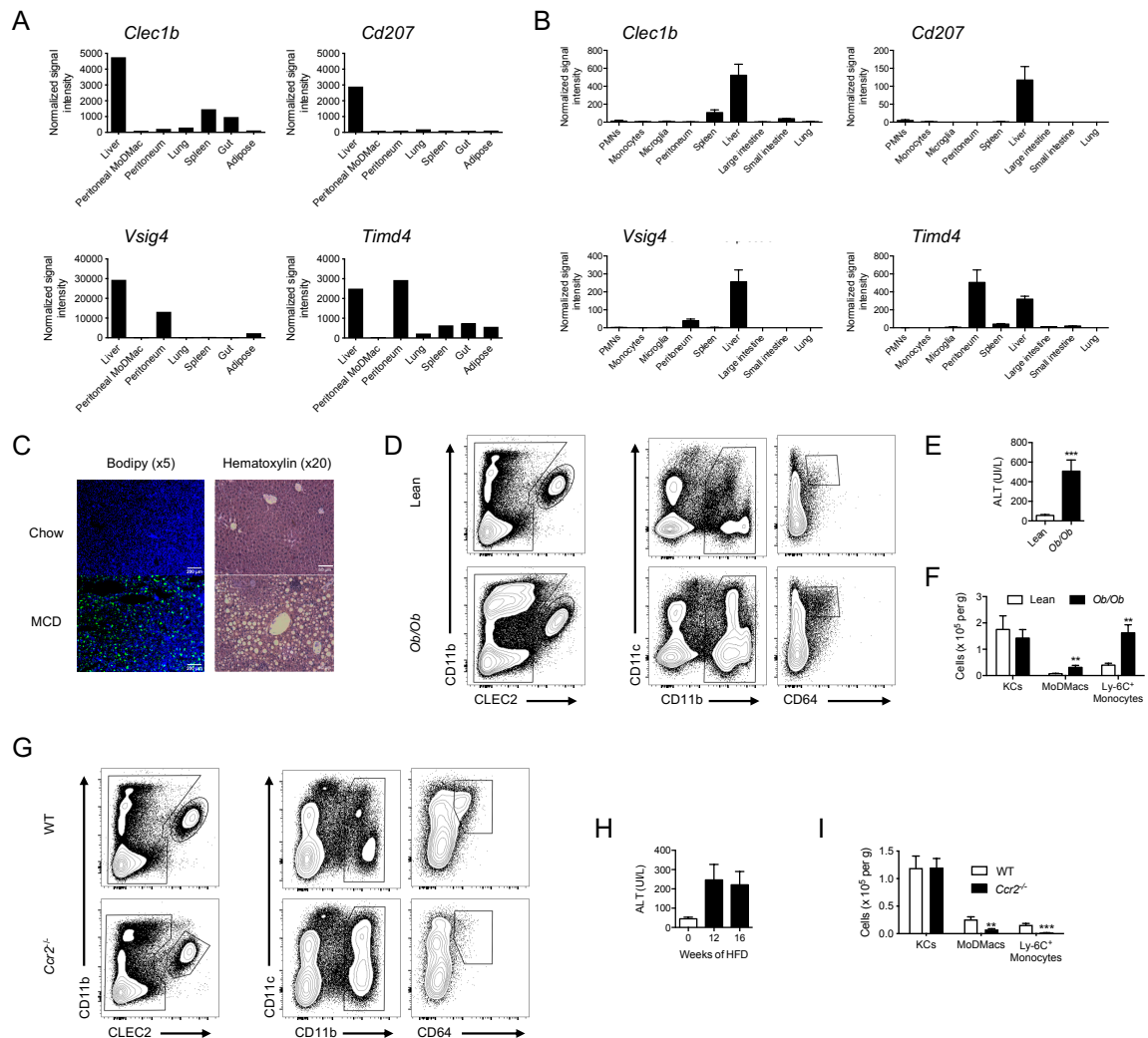
Supplemental Information

Impaired Kupffer Cell Self-Renewal

Alters the Liver Response to Lipid Overload

during Non-alcoholic Steatohepatitis

Sophie Tran, Ines Baba, Lucie Poupel, Sébastien Dussaud, Martine Moreau, Adélaïde Gélineau, Geneviève Marcelin, Elissa Magréau-Davy, Melissa Ouhachi, Philippe Lesnik, Alexandre Boissonnas, Wilfried Le Goff, Björn E. Clausen, Laurent Yvan-Charvet, Florian Sennlaub, Thierry Huby, and Emmanuel L. Gautier



Supplemental Figure S1. Markers selectively expressed by Kupffer cells and strategy to discriminate KCs from monocyte-derived inflammatory macrophages in the liver of *Ob/Ob* mice and HFD-fed mice, Related to Figure 1.

(A) Microarray data obtained from Gautier and *al.* (Nat Immunol 2012) depicting the expression of *Clec1b* (encoding CLEC2), *Cd207*, *Vsig4* and *Timd4* mRNAs in several tissue resident mouse macrophage populations as well as thioglycollate monocyte-derived peritoneal macrophages (MoDMac).

(B) RNAseq data obtained from Lavin and *al.* (Cell 2014) depicting the expression of *Clec1b*, *Cd207*, *Vsig4* and *Timd4* mRNAs in several tissue resident mouse macrophage populations as well as blood monocytes and neutrophils.

(C) Representative pictures of Bodipy- and hematoxylin-stained liver sections depicting macrovesicular lipid droplets in MCD diet-fed animals as compared to chow diet-fed controls.

(D) Gating strategy used to depict the co-residency of KCs and MoDMacs in the steatotic liver of 12 weeks-old *Ob/Ob* mice and their lean controls.

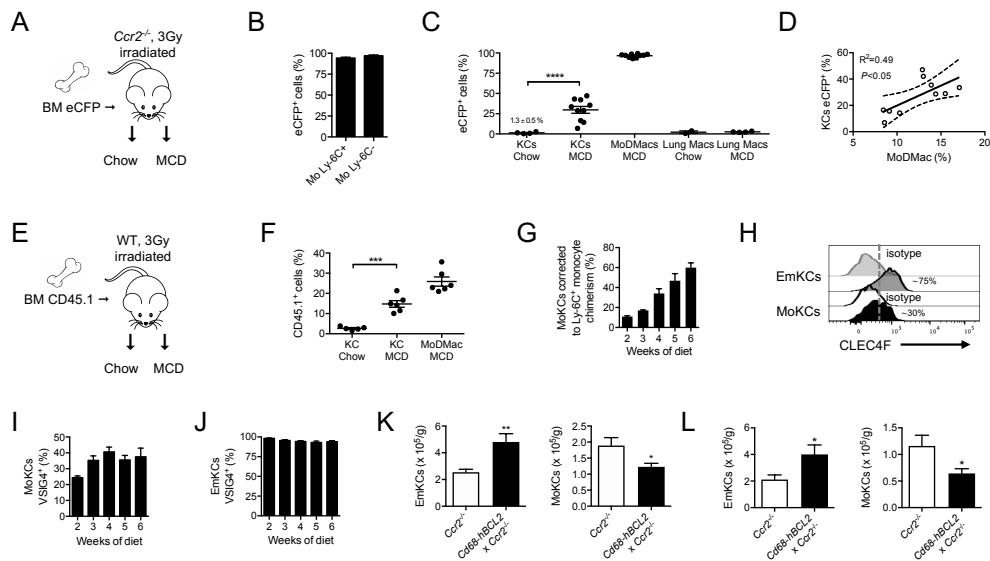
(E) Plasma ALT activity was increased in *Ob/Ob* mice as compared to controls.

(F) Quantification of KCs, monocyte-derived inflammatory macrophages (MoDMacs) and Ly-6C⁺ monocytes in *Ob/Ob* mice and controls.

(G) Gating strategy used to depict the co-residency of KCs and MoDMacs in the steatotic liver of WT and *Ccr2*^{-/-} mice fed a HFD (60% calories from fat) for 16 weeks.

(H) Plasma ALT activity was increased in WT mice fed an HFD for 11 and 16 weeks.

(I) Quantification of KCs, monocyte-derived inflammatory macrophages (MoDMacs) and Ly-6C⁺ monocytes in WT and *Ccr2*^{-/-} mice fed a HFD for 16 weeks.



Supplemental Figure S2. Monocytes participate to the KC pool during NASH, Related to Figures 2, 3 and 4.

(A) Experimental strategy used to track monocytes fate by generating low-irradiation chimeras with *Ccr2*^{-/-} mice as recipients and eCFP⁺ as donor cells.

(B) Quantification of chimerism in circulating Ly-6C⁺ monocytes (Mo Ly-6C⁺) and Ly-6C⁻ monocytes (Mo Ly-6C⁻) blood monocytes at the end of the experiment.

(C) Quantification of the chimerism (eCFP⁺ cells) observed in KCs, MoDMacs and lung alveolar macrophages from *Ccr2*^{-/-}-based chimeras under the chow-fed and MCD-fed conditions.

(D) Correlation between the proportions of monocyte-derived KCs (KCs eCFP⁺) and MoDMacs in MCD-fed animals.

(E) Experimental strategy used to track monocytes fate by generating low-irradiation chimeras with WT mice as recipients and CD45.1⁺ as donor cells.

(F) Quantification of the chimerism (CD45.1⁺ cells) observed in KCs and MoDMacs from WT-based chimeras under the chow-fed and MCD-fed conditions.

(G) Proportion of MoKCs, corrected by the chimerism measured in blood Ly-6C⁺ monocytes, among the KC pool (CLEC2⁺ KCs) over the time course of MCD diet-induced NASH in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras.

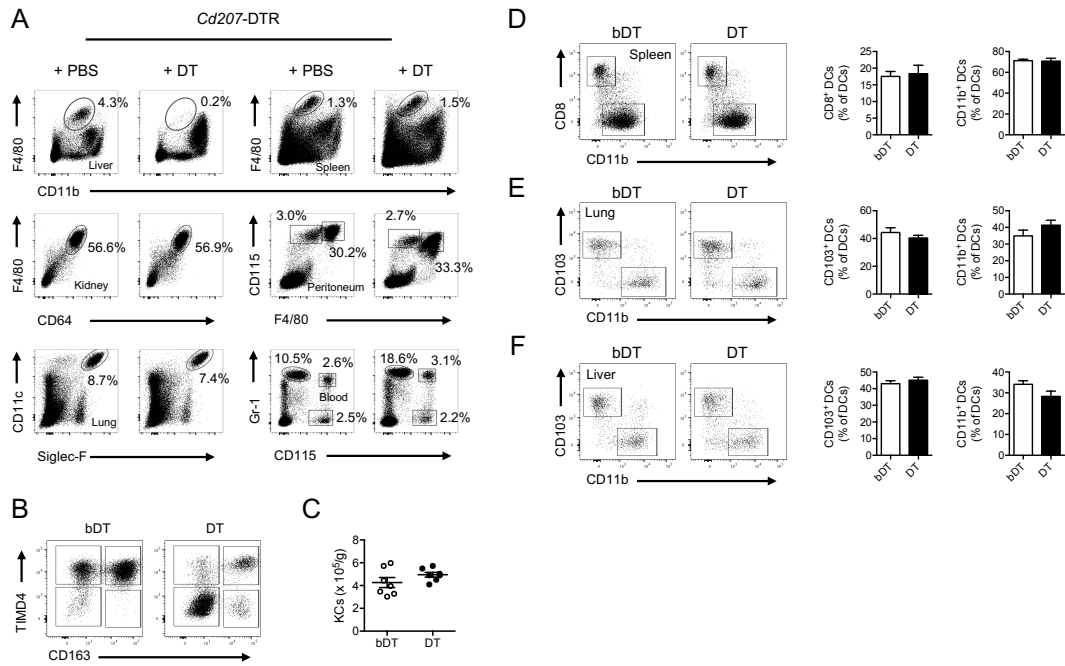
(H) Cell surface expression of CLEC4F on EmKCs and MoKCs in *Ccr2*^{-/-}-based chimeras fed the MCD diet for 6 weeks. The frequency of KCs bearing CLEC4F expression is shown.

(I) Proportion of MoKCs expressing VSIG4 over the course of MCD diet-induced NASH.

(J) Proportion of EmKCs expressing VSIG4 over the course of MCD diet-induced NASH.

(K) EmKCs and MoKCs absolute numbers in male *Ccr2*^{-/-}- and Cd68-hBCL2 x *Ccr2*^{-/-}-based low irradiation chimeras transplanted with bone marrow cells from CD45.1 mice fed the MCD diet for 6 weeks.

(L) EmKCs and MoKCs absolute numbers in female *Ccr2*^{-/-}- and Cd68-hBCL2 x *Ccr2*^{-/-}-based low irradiation chimeras transplanted with bone marrow cells from CD45.1 mice fed the MCD diet for 6 weeks.



Supplemental Figure S3. KCs, other tissue resident macrophages and conventional dendritic cells in *Cd207-DTR* mice injected with diphtheria toxin, Related to Figure 5.

(A) Tissue macrophages residing in the liver, spleen, kidney, peritoneum and lung, as well as circulating monocytes and neutrophils, were analyzed by flow cytometry 24 hours after diphtheria toxin injection in *Cd207-DTR* mice and compared to *Cd207-DTR* animals injected with PBS.

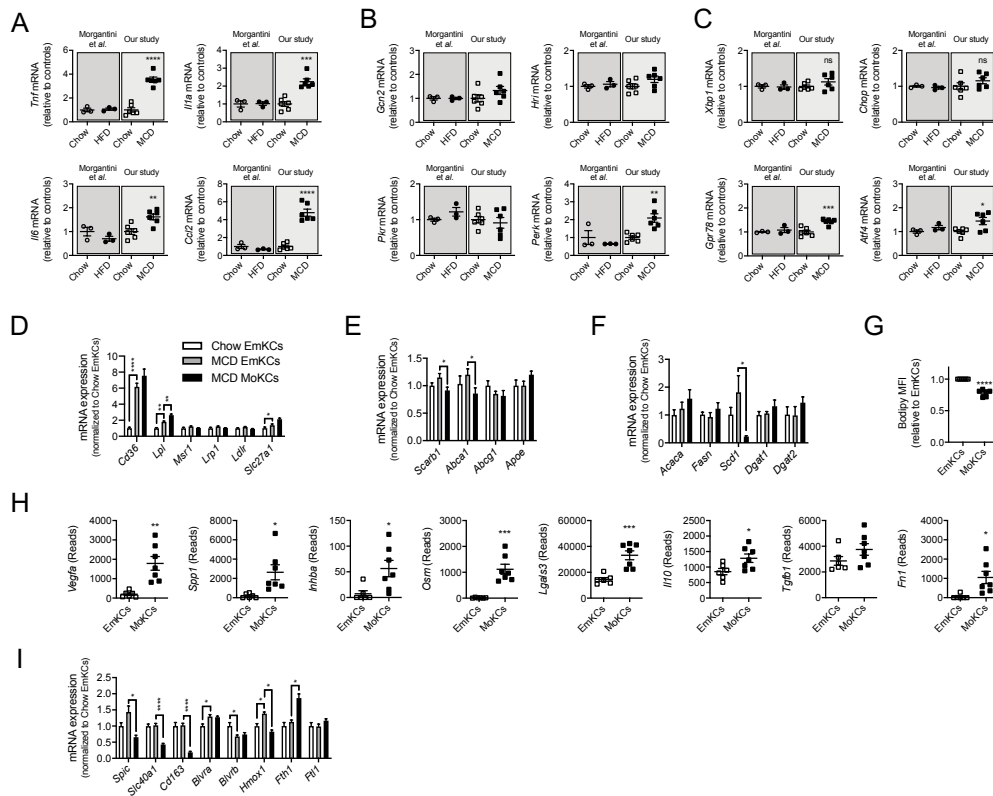
(B) Flow cytometry plots illustrating the replacement of EmKCs (CD11b^{lo} CLEC2^{hi} TIMD4⁺) present in *Cd207-DTR* mice injected with boiled, heat-inactivated diphtheria toxin (bDT) by a majority of MoKCs (CD11b^{lo} CLEC2^{hi} TIMD4⁻, >80% of the KC pool) when *Cd207-DTR* animals were injected with active DT 3 weeks earlier.

(C) KCs number in *Cd207-DTR* animals 3 weeks after bDT and DT injection.

(D) Spleen cDCs subsets in *Cd207-DTR* animals 3 weeks after bDT or DT injection.

(E) Lung cDCs subsets in *Cd207-DTR* animals 3 weeks after bDT or DT injection.

(F) Liver cDCs subsets in *Cd207-DTR* animals 3 weeks after bDT or DT injection.



Supplemental Figure S4. Transcriptional analysis of KC subsets, Related to Figure 6.

(A) Expression of inflammatory genes in EmKCs from mice fed a HFD for 9 weeks (Morgantini C. et al., *Nat. Metabolism*. 2019) or from mice fed the MCD diet for 6 weeks (our current study) and their respective controls.

(B) mRNA expression of the eIF2 α kinases (*Hri*, *Pkr*, *Perk*, and *Gcn2*) that initiates the different arms of the integrated stress response (ISR) in EmKCs from mice fed a HFD for 9 weeks (Morgantini C. et al., *Nat. Metabolism*. 2019) or from mice fed the MCD diet for 6 weeks (our current study) and their respective controls.

(C) mRNA expression of genes downstream the activation the ER stress arm of the ISR by the eIF2 α kinase PERK in EmKCs from mice fed a HFD for 9 weeks (Morgantini C. et al., *Nat. Metabolism*. 2019) or from mice fed the MCD diet for 6 weeks (our current study) and their respective controls.

(D) mRNA expression of genes involved in lipid uptake in EmKCs and MoKCs.

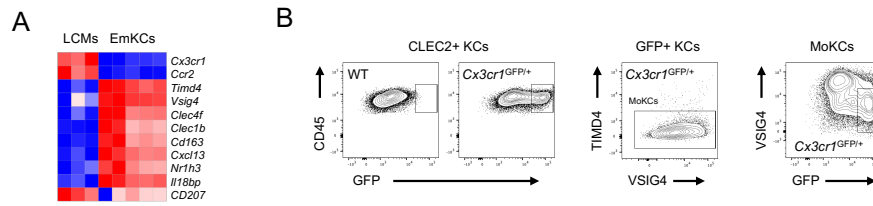
(E) mRNA expression of genes involved in lipid efflux in EmKCs and MoKCs.

(F) mRNA expression of genes involved in fatty acid metabolism in EmKCs and MoKCs.

(G) Intracellular lipids stained by Bodipy in EmKCs and MoKCs from mice fed the MCD diet for 6 weeks.

(H) mRNA expression of genes involved in tissue fibrosis in EmKCs and MoKCs of MCD diet fed mice.

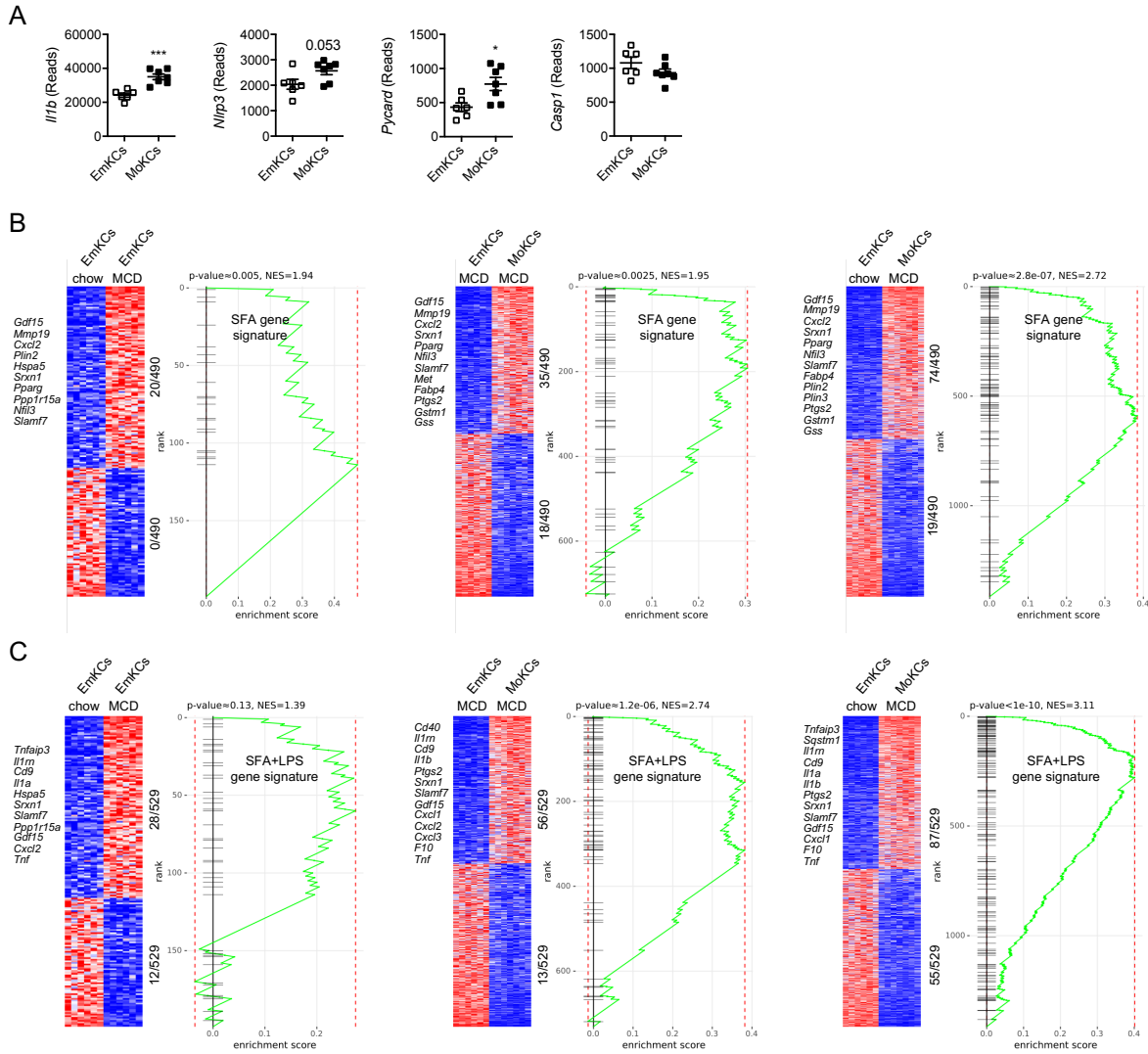
(I) mRNA expression of genes involved in intracellular iron homeostasis in EmKCs and MoKCs.



Supplemental Figure S5. KC markers expression by liver capsular macrophages of naïve mice and CX3CR1 expression by KC subsets during NASH, Related to Figure 6.

(A) Heatmap depicting the expression of KC markers in EmKCs and liver capsular macrophages (LCMs) of naïve control mice. Data were obtained from Siervo et al. *Immunity* 2017.

(B) GFP expression by KC subsets in *Cx3cr1^{Gfp/+}* mice fed the MCD diet for 6 weeks. CX3CR1-GFP expression was absent from TIMD4⁺ EmKCs and only observed in immature VSIG4 negative MoKCs.

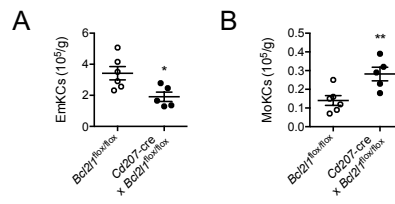


Supplemental Figure S6. Induction of lipid-mediated inflammatory gene signatures in KC subsets, Related to Figure 6.

(A) mRNA expression of genes involved in the activation of NLRP3 inflammasome in EmKCs and MoKCs of MCD diet fed animals.

(B) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the saturated fatty acid gene signature in KC subsets using the Phantastus software. The saturated fatty acid gene signature was generated from a previously published dataset (GSE77104)

(C) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of the saturated fatty acid + LPS signature in KC subsets using the Phantastus software. The saturated fatty acid + LPS gene signature was generated from a previously published dataset (GSE117115)



Supplemental Figure S7. EmKCs and MoKCs numbers in naive mice lacking *Bc2l1* in EmKCs, Related to Figure 7.

(A) EmKCs counts in naive *CD207-cre x Bc2l1^{flox/flox}* mice and *Bc2l1^{flox/flox}* controls.

(B) MoKCs counts in naive *CD207-cre x Bc2l1^{flox/flox}* mice and *Bc2l1^{flox/flox}* controls.

Conclusion et discussion

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la diversité des populations de macrophages hépatiques au cours de la NASH. En conditions physiologiques, il est établi que les KCs se maintiennent par auto-renouvellement, indépendamment des monocytes circulants. Toutefois, plusieurs études ont montré que les monocytes pouvaient participer au pool de KCs dans des contextes de déplétion non physiologique (Beattie et al., 2016; Scott et al., 2016). Jusqu'alors, peu d'études se sont intéressées à ce qu'il advenait dans un contexte physiopathologique. Nous avons donc voulu déterminer si la capacité des KCs à se maintenir était perturbée au cours de la NASH.

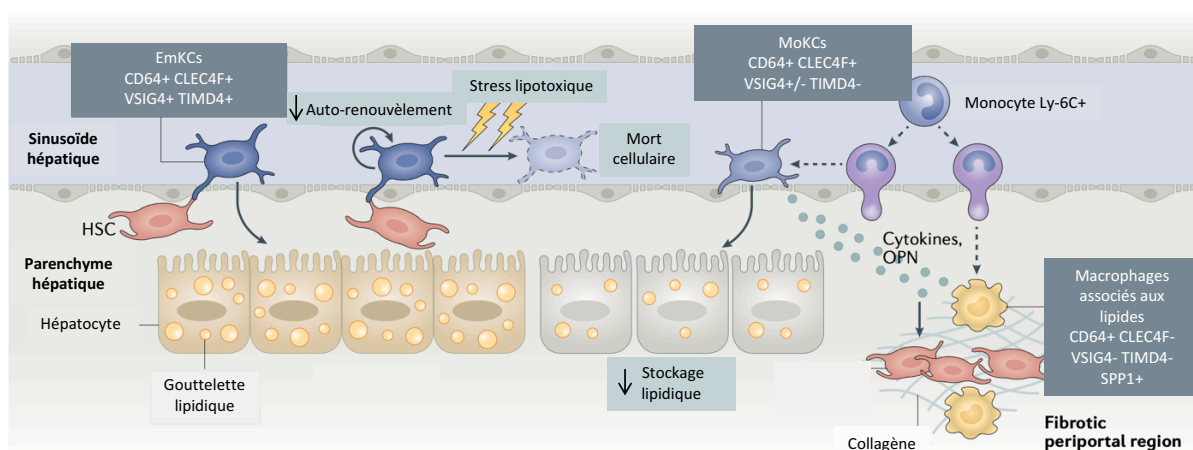


Figure 13. Diversité de macrophages hépatiques au cours de la NASH.

Les KCs d'origine embryonnaire (EmKCs) se localisent au niveau des sinusoides hépatiques et se caractérisent par leur expression des marqueurs suivants CD64+ CLEC4F+ VSIG4+ TIMD4+. En conditions d'homéostasie, les KCs se maintiennent par auto-renouvellement, indépendamment des monocytes circulants. Dans un contexte de NASH, le stress lipotoxique conduit à la mort de EmKCs. Certains monocytes Ly-6C+ se différencient alors en KCs (MoKCs) qui se définissent de la manière suivante : CD64+ CLEC4F+ VSIG4+/- TIMD4-. Les monocytes peuvent aussi se différencier en macrophages associés aux lipides (CD64+ CLEC4F- VSIG4- TIMD4- SPP1+).
Adapté de (Huby and Gautier, 2021)

Nous avons tout d'abord identifié plusieurs marqueurs permettant de différencier les différentes populations de macrophages hépatiques au cours de la NASH. Les EmKCs se caractérisent ainsi par leur expression des marqueurs CLEC4F, VSIG4, TIMD4 et

CLEC2. Nous avons choisi le marqueur CLEC2 pour étudier le pool de macrophages hépatiques au cours de la NASH car il nous permet de différencier les KCs des macrophages inflammatoires dérivés des monocytes (MoDMacs).

Dans un second temps, nous avons pu montrer une altération de l'homéostasie des KCs au cours de la NASH. En effet, contrairement aux conditions d'homéostasie, les monocytes circulants sont recrutés dans le foie et contribuent au pool de KCs lors de la NASH. Ces KCs dérivées des monocytes (MoKCs) expriment CLEC2 mais pas TIMD4, un marqueur canonique des EmKCs, et seulement une partie d'entre elles expriment VSIG4, un autre marqueur caractéristique des EmKCs. Nous avons pu montrer que les EmKCs entraînent en apoptose au cours de la NASH et que la génération des MoKCs est moindre lorsque l'on limite la mort cellulaire des EmKCs. La question se pose de savoir quel serait l'impact sur le foie si l'on force le maintien des EmKCs, bloquant ainsi la génération des MoKCs. On pourrait générer un modèle de souris transgénique dans lequel les EmKCs surexpriment l'anti-apoptotique hBCL2 sous le contrôle d'un promoteur spécifique des EmKCs comme *Clec4f*. Cette lignée *Clec4f*-hBCL2 serait ensuite soumise à un régime induisant la NASH, et nous analyserions le stockage hépatique des lipides ainsi que les dommages hépatiques. Enfin, nous avons constaté qu'après régression de la pathologie, les MoKCs se maintiennent dans le temps et que la grande majorité d'entre elles acquièrent l'expression de VSIG4 alors que peu induisent TIMD4. Aussi, la simple absence d'expression du marqueur TIMD4 permet de différencier les EmKCs des MoKCs. Il serait intéressant de comparer les MoKCs à leurs homologues embryonnaires une fois que l'inflammation est résolue car nous n'avons pas répondu encore à cette question. Une analyse par RNAseq permettrait de comparer les signatures géniques des EmKCs et des MoKCs, après régression de la NASH.

Notre analyse transcriptionnelle par RNAseq nous a ensuite permis de relever des différences notables entre les EmKCs et les MoKCs présentes au cours de la NASH. Par exemple, les MoKCs présentent un niveau d'expression diminué de gènes associés au métabolisme du fer, suggérant que leur capacité à gérer le fer suite au processus d'érythrophagocytose serait altéré comparé aux EmKCs ou que leur capacité à réaliser l'érythrophagocytose est en soi amoindrie. Nous avons également observé une signature transcriptionnelle associée à la lipotoxicité chez les EmKCs au cours de la NASH, ce qui pourrait expliquer leur sensibilité accrue à la mort cellulaire. Enfin, nous avons aussi pu constater que les MoKCs générées au cours de la NASH

présentaient un phénotype pro-inflammatoire, en comparaison à leurs homologues embryonnaires.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'impact fonctionnel des MoKCs sur la physiopathologie de la NASH. Nous avons tout d'abord constaté que les MoKCs limitaient la capacité du foie à stocker des triglycérides en comparaison aux EmKCs. Dans le même temps, nous observons que les MoKCs exacerbent les dommages hépatiques. Ces observations pourraient s'expliquer par le fait que l'on observe une diminution de l'expression de *Scd1* dans le foie lorsque les MoKCs sont prépondérantes. La protéine SCD-1 joue un rôle clé dans le métabolisme des lipides en favorisant le stockage lipidique sous forme de triglycérides non toxiques. Son inhibition mène à l'accumulation d'acides gras insaturés toxiques pour les hépatocytes, induisant leur apoptose, et une baisse de la génération des triglycérides. Une surexpression hépatique de SCD-1 médiée par un AAV (Adeno-Associated Virus) de type 9 dans un contexte où les MoKCs s'accumulent permettrait de valider l'importance de cette voie.

Une des caractéristiques de la NASH est la fibrose hépatique. Il aurait été intéressant de déterminer le rôle des MoKCs sur le développement de la fibrose hépatique. Afin de pouvoir observer cette fibrose les souris doivent être soumises au régime MCD pendant plusieurs mois (Machado et al., 2015). Cependant, une administration aussi longue du régime MCD induirait un remplacement complet des EmKCs par des MoKCs. Par conséquent, il serait difficile de comparer l'impact de ces différentes populations sur la mise en place de la fibrose et son développement. L'utilisation de régimes alternatifs, avec lesquels la fibrose précède le remplacement complet des EmKCs, pourrait peut-être répondre à cette question. Toutefois, nos résultats semblent prometteurs puisque nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de plusieurs gènes pro-fibrotiques chez des animaux arborant majoritairement des MoKCs. Ainsi, le phénotype pro-inflammatoires des MoKCs semblent également favoriser la mise en place de la fibrose.

En résumé, mon travail a permis de montrer que l'homéostasie des EmKCs était altérée au cours de la NASH, menant à la génération de MoKCs qui exacerbent les dommages hépatiques associés à la NASH.

Projet annexe – Role of Kupffer cells-mediated inflammation in Acute Liver Injury

Introduction

Le foie est un organe métabolique central qui joue un rôle majeur dans la défense de l'hôte face aux micro-organismes pathogènes et aux toxines présentes dans la circulation. En raison de leur localisation dans les sinusoides hépatiques, les cellules de Kupffer (KCs), macrophages résidents du foie, jouent un rôle clé dans la défense de l'hôte en éliminant les agents pathogènes qu'elles rencontrent. Grâce à leur emplacement, les KCs sont en contact direct avec le sang portal provenant de l'intestin et pouvant contenir diverses endotoxines telles que les lipopolysaccharides (LPS). Le LPS est un constituant de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives qui peut être à l'origine d'un choc septique lorsqu'il est présent en forte concentration dans le sang. Cette endotoxine est reconnue par le récepteur TLR4 et induit l'activation de la cascade de signalisation NF- κ B à l'origine de la production de nombreuses cytokines inflammatoires telles que TNF α et IL-6. Les effets inflammatoires du LPS peuvent être exacerbés dans différents contextes notamment dans le cas d'une maladie hépatique chronique préexistante ou en combinaison avec d'autres molécules tel que le D-Galactosamine (D-GalN).

L'un des modèles expérimentaux largement utilisé pour les lésions hépatiques aiguës consiste en la co-administration de LPS et de D-GalN. Le D-GalN, principalement métabolisé par les hépatocytes, aggrave considérablement les effets du LPS en sensibilisant les hépatocytes à la mort cellulaire induite par les cytokines produites sous l'effet du LPS. Ainsi, l'hépatotoxicité causée par le traitement LPS/D-GalN repose sur l'expression élevée de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1 β , ainsi qu'à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Toutefois, la source de ces cytokines n'a jusqu'ici pas été formellement identifiée, bien que les KCs demeurent un candidat indiqué.

Aussi, mon objectif est de déterminer le rôle de l'inflammation médiée par les KCs dans ce modèle d'insuffisance hépatique aiguë et dans des modèles d'insuffisance hépatique aiguë sur maladie chronique.

Résultats

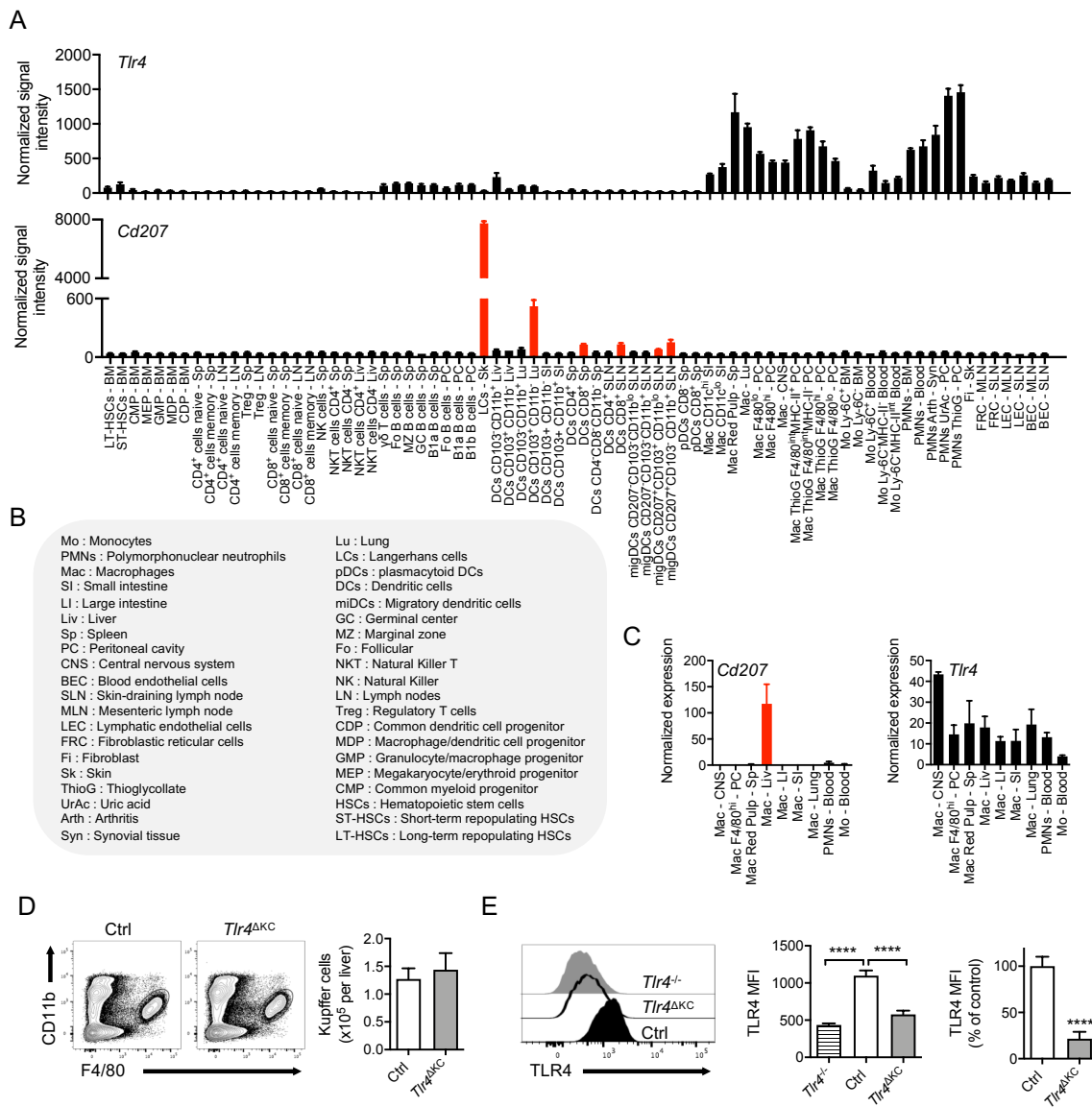


Figure 1 : Les souris *Cd207-cre x Tlr4^{flox/flox}* présentent une délétion de *Tlr4* spécifiquement dans les KCs.

A) Expression de *Tlr4* et de *Cd207* dans divers types de cellules immunitaires de souris wild-type. **B)** Liste des abréviations employées dans la Fig1.A. **C)** Expression de *Cd207* et *Tlr4* dans différentes populations de macrophages de souris wild-type. **D)** Cytométrie en flux et graphique montrant le nombre de KCs dans les souris *Tlr4^{ΔKC}* et les souris contrôles. **E)** Expression de TLR4 à la surface des cellules de Kupffer chez des souris *Tlr4* KO, des souris *Tlr4^{ΔKC}* et des souris contrôles.

Afin de déterminer le rôle de l'inflammation médiée par les KCs dans un modèle d'hépatite aigue, nous avons généré une lignée murine présentant une délétion du récepteur TLR4 dans les KCs. Les souris *Tlr4^{ΔKC}* ont été obtenues en croisant des souris floxées pour le gène *Tlr4* avec des souris exprimant la cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Cd207*. Plusieurs types cellulaires expriment *Cd207*

parmi lesquels les KCs (**Fig. 1C**) mais également les cellules de Langerhans (LCs) et les cellules dendritiques CD8⁺ / CD103⁺ (**Fig. 1A**). Dans les cellules immunitaires, le gène *Tlr4* est quant à lui principalement exprimé par les macrophages (**Fig. 1A**) (Gautier et al., 2012). Au sein des macrophages, seul les KCs expriment *Cd207* (**Fig. 1C**). Par conséquent, la délétion de *Tlr4* sous le contrôle du promoteur *Cd207* permet une délétion spécifique du gène *Tlr4* dans les KCs (*Tlr4*^{ΔKC}). Le nombre de KCs n'est pas affecté chez les animaux *Tlr4*^{ΔKC} (**Fig. 1D**). Afin de valider notre modèle, nous avons mesuré l'expression de TLR4 à la surface des KCs. On constate une diminution significative de l'expression de TLR4 chez les souris *Tlr4*^{ΔKC} en comparaison aux animaux contrôles (**Fig. 1E**). Néanmoins, il semble que 20% des KCs expriment encore TLR4 dans ce modèle (**Fig. 1E**). Dans les populations cellulaires, autres que les KCs, exprimant *Cd207* on n'observe pas de différence dans l'expression de TLR4 en comparaison aux contrôles (données non présentées).

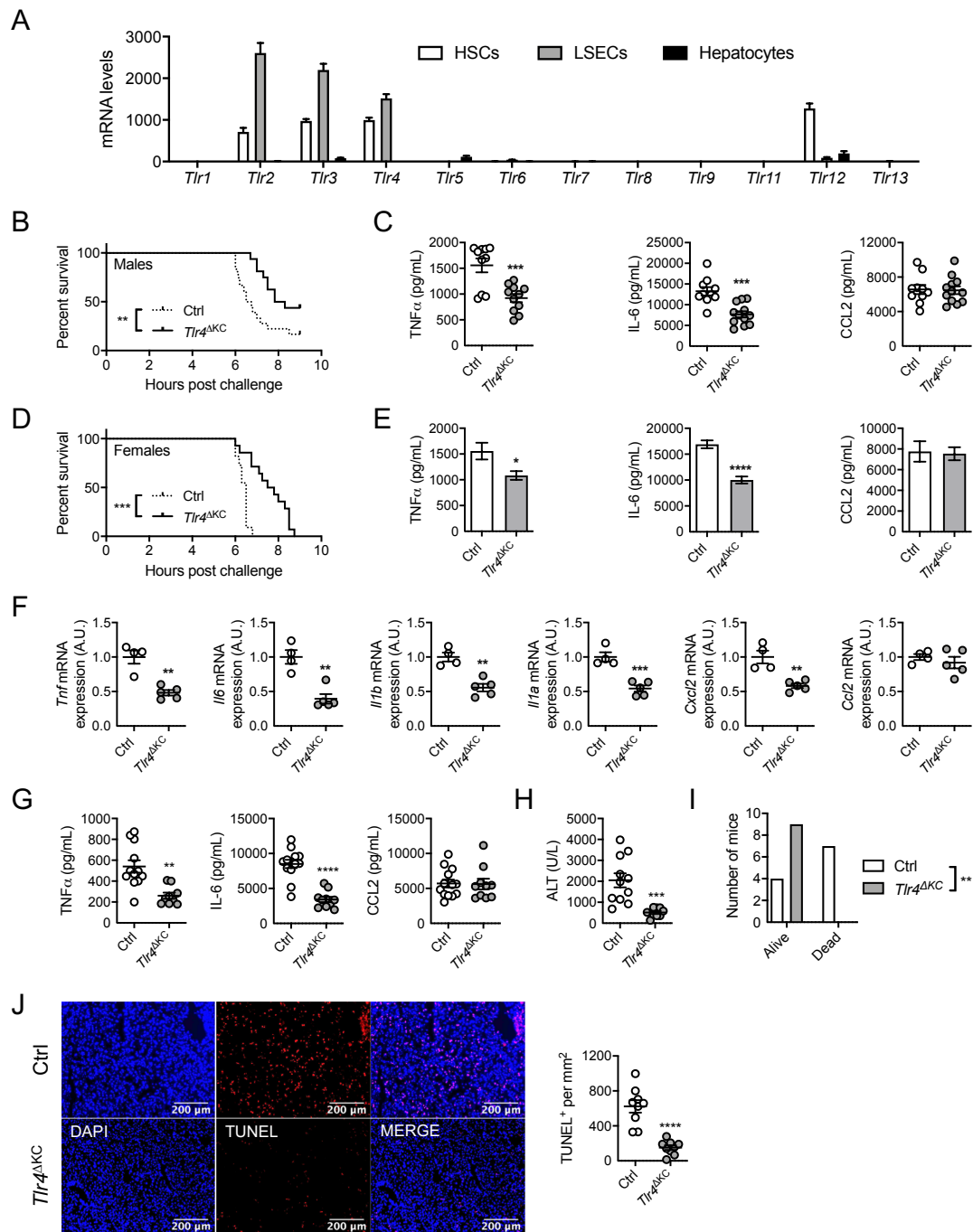


Figure 2 : La signalisation TLR4 dans les KCs favorise l'insuffisance hépatique aiguë médiée par le LPS.

A) Expression génique des différents TLRs dans les cellules hépatiques (HSCs : cellules étoilées hépatiques ; LSECs : cellules endothéliales sinusoidales hépatiques ; hépatocytes). Courbes de mortalité de souris mâles (**B**) et femelles (**D**) *Tlr4^{ΔKC}* et leurs contrôles soumis au challenge LPS/D-Galactosamine (LPS/D-GalN) (50 ng LPS + 12,5 mg de D-GalN pour les mâles et 100 ng LPS + 10 mg de D-GalN pour les femelles). Concentrations plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-6, et de la chimiokine CCL2 1h après le challenge LPS/D-GalN chez des souris mâles (**C**) et femelles (**E**) *Tlr4^{ΔKC}* et leurs contrôles aux doses mentionnées ci-dessus. **F)** Expression de gènes de l'inflammation dans le foie de souris mâles *Tlr4^{ΔKC}* et leurs contrôles 1h après avoir été soumis au challenge LPS/D-GalN (50 ng LPS + 12,5 mg de D-GalN). **G)** Concentrations plasmatiques des

cytokines pro-inflammatoires $TNF\alpha$ et IL-6, et de la chimiokine CCL2 1h après un challenge LPS/D-GalN moins élevé (10 ng LPS + 10 mg de D-GalN. **H**) Dosage des transaminases (ALT) plasmatiques chez des souris $Tlr4^{AKC}$ et leurs contrôles soumis au challenge LPS/D-GalN (10 ng LPS + 10 mg de D-GalN). **I**) Graphique représentant le nombre de souris $Tlr4^{AKC}$ et contrôles vivantes ou mortes 6h après un challenge 10 ng LPS + 10 mg de D-GalN. **J**) Marquage de l'apoptose par la méthode TUNEL sur des coupes histologiques de foies de souris $Tlr4^{AKC}$ et contrôles 6h après un challenge 10 ng LPS + 10 mg de D-GalN, et quantification associée.

Une fois le modèle $Tlr4^{AKC}$ généré, nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de l'inflammation médiée par les KCs dans un contexte d'insuffisance hépatique aigüe (Acute Liver Failure – ALF). Afin de modéliser l'ALF, nous avons eu recours à la co-administration de LPS et de D-galactosamine (D-GalN). Ce modèle, comme discuté dans mon introduction de thèse, induit une hépatite fulminante avec des lésions hépatiques rapides caractéristiques de l'ALF. Nos premières observations montraient que les animaux $Tlr4^{AKC}$ succombaient suivant une cinétique similaire à leurs contrôles après la co-administration d'1 μ g de LPS et de 10 mg de D-GalN (données non présentées). Cette dose de LPS est probablement supraphysiologique, mais elle suggère que d'autres types cellulaires du foie comme les cellules endothéliales sinusoidales ou les cellules étoilées (**Fig. 2A**) sont à même de répondre au LPS et de produire les cytokines nécessaires pour induire l'ALF, noyant ainsi le rôle des KCs dans ces conditions. Les souris $Tlr4^{AKC}$ ont alors été soumises au challenge LPS/D-GalN avec des doses de LPS beaucoup plus faibles. Nous constatons que les souris $Tlr4^{AKC}$ meurent plus tardivement que leurs contrôles lorsque les mâles sont traités avec 50 ng LPS et les femelles avec 100 ng de LPS (**Fig. 2B,2D**). Ce délai de mortalité est ainsi observé indépendamment du sexe (**Fig. 2B,2D**). De plus, les concentrations circulantes des cytokines pro-inflammatoires $TNF\alpha$ et IL-6, mais pas celles de la chimiokine CCL2, sont significativement diminuées chez les souris $Tlr4^{AKC}$ en comparaison aux contrôles chez les deux sexes (**Fig. 2C,2E**). De même, nous avons mesuré l'expression hépatique de gènes pro-inflammatoires par RT-qPCR. Les souris $Tlr4^{AKC}$ présentent une diminution d'expression de gènes inflammatoires tels que *Tnf*, *Il6*, *Il1a*, *Il1b* et *Cxcl2* en comparaison aux contrôles (**Fig. 2F**). Ainsi, il semblerait que l'inflammation médiée par les KCs favorise l'aggravation de l'hépatite fulminante. Par la suite, afin d'exacerber les différences observées entre les souris $Tlr4^{AKC}$ et les souris contrôles, nous avons réduit la dose de LPS à 10 ng. A cette dose, nous observons également une forte baisse dans les concentrations des cytokines pro-inflammatoires circulantes chez les souris $Tlr4^{AKC}$ (**Fig. 2G**). De plus, les animaux $Tlr4^{AKC}$ présentent

des taux d'ALT, enzymes reflétant la souffrance hépatique, significativement réduits en comparaison aux contrôles suite au challenge LPS/D-GaIN (**Fig. 2H**). A cette faible dose de LPS, les souris *Tlr4^{ΔKC}* sont même complètement protégées de la mort induite par le challenge LPS/D-GaIN (**Fig. 2I**). Enfin, un marquage de l'apoptose montre que les souris *Tlr4^{ΔKC}* ont significativement moins de cellules apoptotiques dans leur foie que leurs contrôles (**Fig. 2J**). Ainsi, à faibles doses, l'inflammation médiée par les KCs favorise les lésions hépatiques induites par le challenge LPS/D-GaIN.

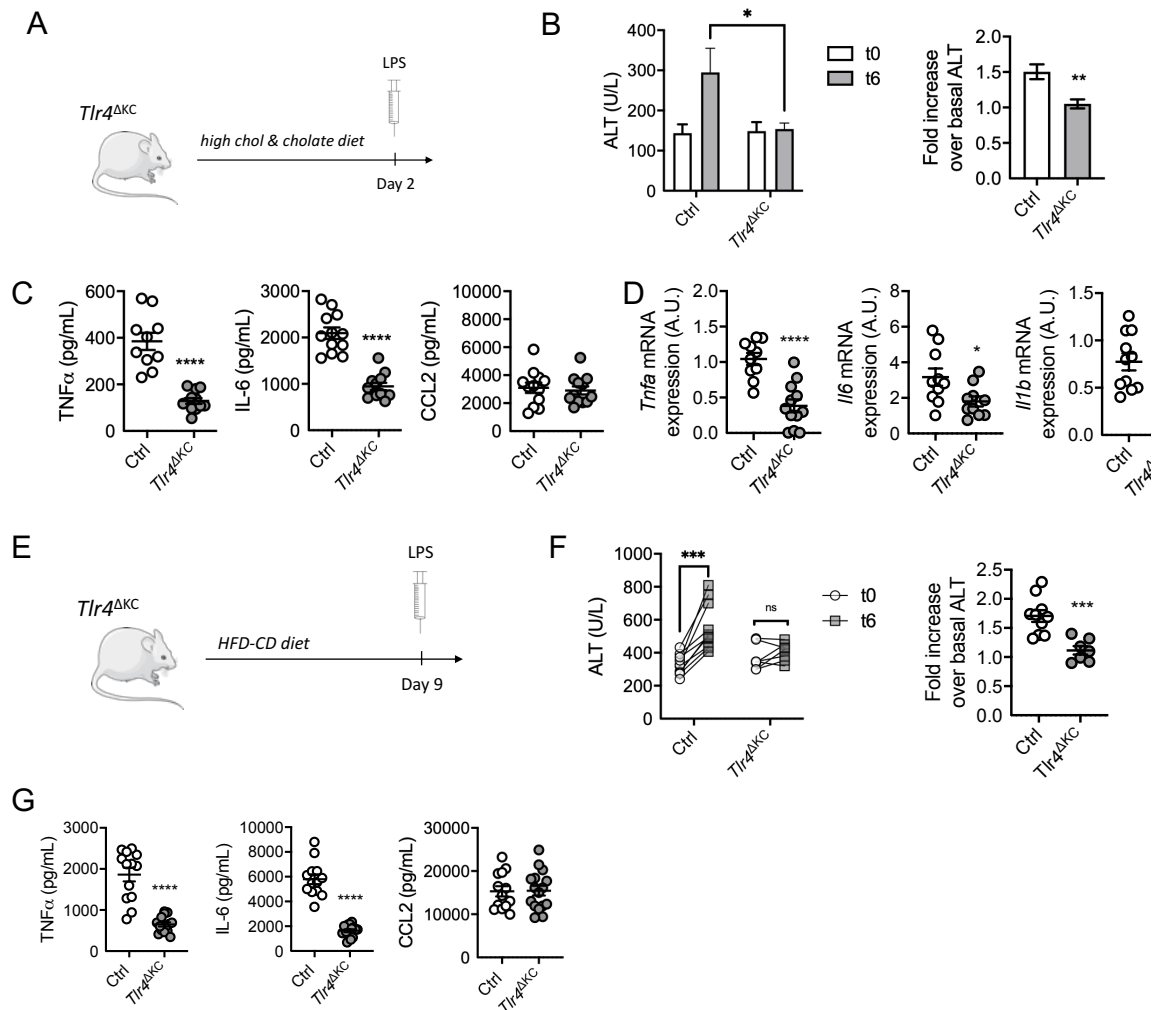


Figure 3 : L'activation des KCs induite par le LPS aggrave les lésions hépatiques dans des modèles de pathologies hépatiques.

A) et **E)** Représentations schématiques du modèle expérimental utilisé. **B)** Dosage des ALTs plasmatiques chez des souris *Tlr4^{ΔKC}* et leurs contrôles après 2 jours de régime enrichi en cholestérol et supplémenté en cholate avant (t0) et 6h après injection de LPS (10 ng) (t6). **C)** Concentrations plasmatiques des cytokines inflammatoires TNF α et IL-6, et de la chimiokine CCL2 1h après l'administration de LPS chez des souris *Tlr4^{ΔKC}* et leurs contrôles préalablement nourris pendant 2 jours avec un régime enrichi en cholestérol et supplémenté en cholate. **D)** Expression de gènes de l'inflammation dans le foie de souris *Tlr4^{ΔKC}* et leurs contrôles préalablement nourris pendant 2 jours avec un régime enrichi en cholestérol et supplémenté en cholate et 1h après administration de LPS. **F)** Dosage des transaminases (ALT) plasmatiques des souris *Tlr4^{ΔKC}* et de leurs contrôles après 9 jours

de régime HFD-CD avant injection de LPS (10 ng) (t0) et 6h après (t6). **G**) Concentrations plasmatiques des cytokines inflammatoires $TNF\alpha$, IL-6 et IL-10 et de la chimiokine CCL2 1h après l'administration de LPS dans les souris $Tlr4^{AKC}$ et leurs contrôles.

Ce modèle à très faibles doses de LPS s'avère plus physiologique puisqu'il mime d'avantage les conditions physiopathologiques de l'ALF ou d'autres pathologies favorisant la survenue de l'ALF. Toutefois, l'utilisation du D-GalN comme agent sensibilisant du foie s'avère moins relevant d'une condition physiopathologique. Afin de nous rapprocher des conditions observables chez l'homme, nous nous sommes intéressés au concept d'insuffisance hépatique aigüe sur maladie chronique (ACLF). Selon ce concept, lorsque le foie est atteint par une cirrhose notamment, l'inflammation induite par les endotoxines circulantes comme le LPS est exacerbée. Afin d'étudier le rôle de l'activation des KCs induite par le LPS dans ce contexte, nous avons soumis les souris $Tlr4^{AKC}$ et leurs contrôles à différents régimes afin de sensibiliser leur foie puis nous avons administré une dose de LPS de 10ng (**Fig. 3A, 3E**). Chez les souris soumises à un régime enrichi en cholestérol et supplémenté en cholate pendant 2 jours, nous constatons que le régime n'induit pas de différence d'ALT entre les souris $Tlr4^{AKC}$ et leurs contrôles (**Fig. 3B**). En revanche, suite à l'administration du LPS, les ALT sont significativement augmentées chez les souris contrôles tandis que les ALT des souris $Tlr4^{AKC}$ restent inchangées (**Fig. 3B**). De plus, les concentrations circulantes des cytokines pro-inflammatoires $TNF\alpha$ et IL-6 sont significativement plus basses chez les souris $Tlr4^{AKC}$ que chez les contrôles (**Fig. 3C**). Il en est de même avec l'expression des gènes inflammatoires tels que *Tnf*, *Il-6* et *Il-1b* qui est réduite chez les souris $Tlr4^{AKC}$ comparé à leurs contrôles (**Fig. 3D**). Ainsi, l'activation des KCs médiée par le LPS aggrave les lésions hépatiques dans ce modèle d'insuffisance hépatique aigüe sur maladie chronique. Suivant une approche similaire, les souris ont été soumises à un régime HFD-CD durant 9 jours (**Fig. 3E**). Dans ce modèle également nous constatons que les souris $Tlr4^{AKC}$ sont protégées de l'augmentation des ALTs observées chez les contrôles suite à l'injection de LPS (**Fig. 3F**). De même, les concentrations circulantes des cytokines pro-inflammatoires $TNF\alpha$ et IL-6 sont significativement plus basses chez les souris $Tlr4^{AKC}$ que chez leurs contrôles (**Fig. 3G**). En résumé, l'activation des KCs aggravent les lésions hépatiques de l'insuffisance hépatique aigüe sur maladie chronique.

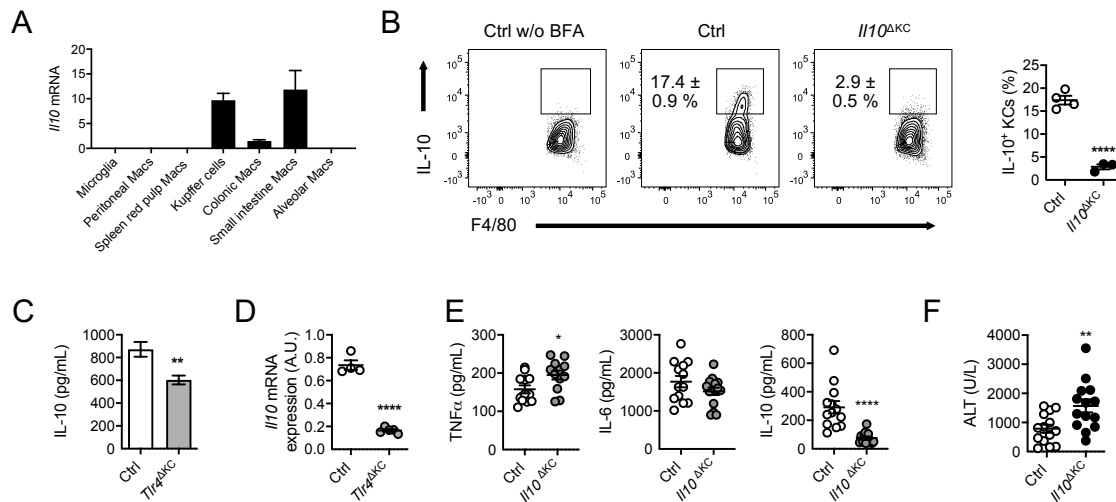


Figure 4 : La production d'IL-10 par les KCs atténue les lésions hépatiques dans un modèle d'insuffisance hépatique aigüe.

A) Expression du gène *Il10* dans les macrophages résidents. **B)** Production de l'IL-10 dans les KCs de souris contrôles et de souris invalidées pour l'*Il10* dans les KCs (*Il10*^{ΔKC}) **C)** Concentration plasmatique de l'IL-10 chez des souris *Tlr4*^{ΔKC} et leurs contrôles 1h après un challenge LPS/D-GalN (100 ng LPS + 10 mg de D-GalN). **D)** Expression du gène *Il10* dans le foie des souris *Tlr4*^{ΔKC} et leurs contrôles soumis à un challenge LPS/D-GalN (50 ng LPS + 12,5 mg de D-GalN). **E)** Concentrations plasmatiques des cytokines TNF α , IL-6 et IL-10 chez des souris *Il10*^{ΔKC} et leurs contrôles 1h après un challenge LPS/D-GalN (2 ng LPS + 10 mg de D-GalN). **F)** Dosage des transaminases (ALT) plasmatiques des souris *Il10*^{ΔKC} et de leurs contrôles 6h après un challenge LPS/D-GalN (2 ng LPS + 10 mg de D-GalN).

Nos données montrent donc que les KCs produisent des cytokines inflammatoires en réponse au LPS, favorisant ainsi la survenue de l'ALF. Toutefois, nous nous sommes intéressés au rôle de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 produite par les KCs dans l'insuffisance hépatique aigüe. En effet, nous avons constaté que les KCs font partie des macrophages qui expriment le plus fortement l'*Il10* (**Fig. 4A**) et qu'ils pourraient ainsi représenter l'une des sources principales d'IL-10 dans le foie. Chez les souris *Tlr4*^{ΔKC} soumises au challenge LPS/D-GalN, nous avons constaté que les concentrations plasmatiques d'IL-10 étaient réduites en comparaison à leurs contrôles (**Fig. 4C**). De même, après un challenge LPS/D-GalN, l'expression hépatique du gène *Il10* est très fortement réduit chez les souris *Tlr4*^{ΔKC} en comparaison à leurs contrôles (**Fig. 4D**). L'ensemble de ces observations confirment que les KCs représentent une source majeure d'IL-10. Afin d'évaluer l'impact de l'IL-10 produite par les KCs dans le contexte d'insuffisance hépatique aigüe, nous avons généré un modèle d'inactivation d'*Il10* dans les KCs en croisant les souris *Cd207-cre* avec des animaux dont le gène

de l'IL-10 est floxé (*Il10^{ΔKC}*). Nous montrons que la production d'IL-10 est fortement réduite chez les souris *Il10^{ΔKC}* (**Fig. 4B**). Ces souris *Il10^{ΔKC}* ont ensuite été soumises au challenge LPS/D-GalN (2 ng LPS + 10 mg de D-GalN). Nous avons constaté une légère augmentation de la concentration plasmatique de TNF α chez les souris *Il10^{ΔKC}* mais pas de différence de concentrations d'IL-6 (**Fig. 4E**). De plus, les souris *Il10^{ΔKC}* présentent des taux d'ALT significativement élevés suite au challenge LPS/D-GalN (**Fig. 4F**). Ainsi, ces résultats semblent montrer que la production d'IL-10 par les KCs atténue les lésions hépatiques induites dans le contexte d'insuffisance hépatique aigüe. Ces données mettent ainsi en évidence le rôle complexe des KCs dans l'ALF.

Conclusion et Perspectives

Nos résultats ont mis en évidence le rôle délétère de l'inflammation médiée par les KCs dans un modèle d'insuffisance hépatique aigüe. De plus, les KCs aggravent également l'inflammation médiée par le LPS et les lésions hépatiques dans des modèles d'insuffisance hépatique aigüe sur maladie chronique. Toutefois, nous montrons un rôle double des KCs car leur production d'IL-10 est protectrice dans l'ALF. Pour la suite de notre étude, nous avons décidé de générer un modèle de délétion de *Myd88* dans les KCs (*Myd88^{ΔKC}*). La protéine Myd88 est responsable de l'inflammation médiée par de nombreux TLRs, et les KCs ne répondront donc plus à un large spectre d'endotoxines dans ce modèle. Ce modèle permettra de tester le rôle de l'activation des KCs par les endotoxines dans des pathologies chronique comme la NASH. Ces souris *Myd88^{ΔKC}* ont tout d'abord été soumises au challenge LPS/D-GalN et nous avons constaté qu'elles étaient protégées des lésions hépatiques comparé à leurs contrôles, comme précédemment observé pour les animaux *Tlr4^{ΔKC}*. Nous souhaitons maintenant étudier le rôle de l'inflammation médiée par les KCs au cours de la NASH. Nous allons donc soumettre les souris *Myd88^{ΔKC}* et leurs contrôles à un régime induisant la NASH (régime de type western enrichi en cholestérol, en graisse et en sucres). Sachant que nos résultats montrent également un rôle protecteur de la production d'IL-10 par les KCs dans un contexte d'insuffisance hépatique aigüe, nous souhaiterions étudier l'impact de la production d'IL-10 par les KCs dans des modèles d'insuffisance hépatique aigüe sur maladie chronique mais aussi dans des modèles de pathologies chroniques comme la NASH. Cette étude permettra de mieux

comprendre comment les KCs influencent le développement des atteintes hépatiques aiguës et chroniques.

Valorisation des résultats de la thèse

Publications scientifiques

Tran S*, **Baba I***, Poupel L, Dussaud S, Moreau M, Gélinau A, Marcelin G, Magréau-Davy E, Ouhachi M, Lesnik P, Boissonnas A, Le Goff W, Clausen BE, Yvan-Charvet L, Sennlaub F, Huby T, Gautier EL. Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity*. 2020 Sep 15;53(3):627-640.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2020.06.003. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32562600.

Paccoud R, Saint-Laurent C, Piccolo E, Tajan M, Dortignac A, Pereira O, Le Gonidec S, **Baba I**, Gélinau A, Askia H, Branchereau M, Charpentier J, Personnaz J, Branka S, Auriou J, Deleruyelle S, Canouil M, Beton N, Salles JP, Tauber M, Weill J, Froguel P, Neel BG, Araki T, Heymes C, Burcelin R, Castan I, Valet P, Dray C, Gautier EL, Edouard T, Pradère JP, Yart A. SHP2 drives inflammation-triggered insulin resistance by reshaping tissue macrophage populations. *Sci Transl Med*. 2021 Apr 28;13(591):eabe2587. doi: 10.1126/scitranslmed.abe2587. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33910978.

Gélinau A, Marcelin G, Ouhachi M, **Baba I**, Christine Rouault C, Lesnik P, Yvan-Charvet L, Tussiwand R, Huby T, Gautier EL. - Dietary fiber-mediated improvement of glucose tolerance requires type 2 conventional dendritic cells in mice fed a high-fat diet. *En révision*.

Communication orale

Baba I*, Tran S*, Poupel L, Moreau M, Gélinau A, Marcelin G, Ouhachi M, Boissonnas A, Le Goff W, Sennlaub F, Huby T, Gautier EL. Self-renewing monocyte-derived Kupffer cells generated during non-alcoholic steatohepatitis limit hepatic triglyceride storage. *Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose 2019*. 19-21 juin 2019, Biarritz, France.

Communications affichées

Baba I, Tran S, Gélinau A, Huby T, Gautier EL. Deciphering the metabolic impact of endotoxin sensing by Kupffer cells in obesity. *20th Doctoral School Days*, 20-21 mai 2019, Paris, France.

Baba I*, Tran S*, Poupel L, Moreau M, Gélinau A, Marcelin G, Ouhachi M, Boissonnas A, Le Goff W, Sennlaub F, Huby T, Gautier EL. Self-renewing monocyte-derived Kupffer cells generated during non-alcoholic steatohepatitis limit hepatic triglyceride storage. *Congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose 2019*. 19-21 juin 2019, Biarritz, France.

Gélinau A, Ouhachi M, **Baba I**, Huby T, Gautier EL. IRF4-dependent DCs mediate dietary fibers impact on intestinal Th17 cells to maintain metabolic fitness upon high-fat diet feeding. *Congrès de la Société Française d'Immunologie 2019*, 12-14 novembre 2019, Nantes, France.

Bibliographie

Acharya, S.K., Batra, Y., Hazari, S., Choudhury, V., Panda, S.K., and Dattagupta, S. (2002). Etiopathogenesis of acute hepatic failure: Eastern versus Western countries. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *17 Suppl 3*, S268-273.

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* *9*, 143–150.

Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H.E., and Seiler, P. (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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 1148–1155.

Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F.M.V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* *10*, 1538–1543.

Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., McNagny, K.M., and Rossi, F.M.V. (2011). Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat. Neurosci.* *14*, 1142–1149.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193–197.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* *124*, 783–801.

Alder, J.K., Georgantas, R.W., Hildreth, R.L., Kaplan, I.M., Morisot, S., Yu, X., McDevitt, M., and Civin, C.I. (2008). Kruppel-Like Factor 4 Is Essential for Inflammatory Monocyte Differentiation In Vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 5645–5652.

Angulo, P., Kleiner, D.E., Dam-Larsen, S., Adams, L.A., Bjornsson, E.S., Charatcharoenwittaya, P., Mills, P.R., Keach, J.C., Lafferty, H.D., Stahler, A., 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*, 389-397.e10.

Anhê, F.F., Barra, N.G., Cavallari, J.F., Henriksbo, B.D., and Schertzer, J.D. (2021). Metabolic endotoxemia is dictated by the type of lipopolysaccharide. *Cell Rep.* *36*, 109691.

Anstee, Q.M., Reeves, H.L., Kotsiliti, E., Govaere, O., and Heikenwalder, M. (2019). From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* *16*, 411–428.

Antoine, D.J., Williams, D.P., Kipar, A., Jenkins, R.E., Regan, S.L., Sathish, J.G., Kitteringham, N.R., and Park, B.K. (2009). High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *112*, 521–531.

Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., and Chazaud, B. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* *204*, 1057–1069.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* *317*, 666–670.

Avraham-Davidi, I., Yona, S., Grunewald, M., Landsman, L., Cochain, C., Silvestre, J.S., Mizrahi, H., Faroja, M., Strauss-Ayali, D., Mack, M., et al. (2013). On-site education of VEGF-recruited monocytes improves their performance as angiogenic and arteriogenic accessory cells. *J. Exp. Med.* *210*, 2611–2625.

Bain, C.C., and Mowat, A.M. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* *260*, 102–117.

Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Guillems, M., Malissen, B., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol.* *6*, 498–510.

Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Perdiguero, E.G., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* *15*, 929–937.

Bain, C.C., Hawley, C.A., Garner, H., Scott, C.L., Schridde, A., Steers, N.J., Mack, M., Joshi, A., Guillems, M., Mowat, A.M.I., et al. (2016). Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nat. Commun.* *7*, ncomms11852.

Bajt, M.L., Lawson, J.A., Vonderfecht, S.L., Gujral, J.S., and Jaeschke, H. (2000). Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a caspase-8 inhibitor in vivo: evidence for a postmitochondrial processing of caspase-8. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *58*, 109–117.

Balmer, M.L., Slack, E., de Gottardi, A., Lawson, M.A.E., Hapfelmeier, S., Miele, L., Grieco, A., Van Vlierberghe, H., Fahrner, R., Patuto, N., et al. (2014). The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota. *Sci. Transl. Med.* *6*, 237ra66.

Beattie, L., Sawtell, A., Mann, J., Frame, T.C.M., Teal, B., de Labastida Rivera, F., Brown, N., Walwyn-Brown, K., Moore, J.W.J., MacDonald, S., et al. (2016). Bone

marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions. *J. Hepatol.* 65, 758–768.

Bernal, W., and Wendon, J. (2013). Acute Liver Failure. *N. Engl. J. Med.* 369, 2525–2534.

Bernard, J.J., Cowing-Zitron, C., Nakatsuji, T., Muehleisen, B., Muto, J., Borkowski, A.W., Martinez, L., Greidinger, E.L., Yu, B.D., and Gallo, R.L. (2012). Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat. Med.* 18, 1286–1290.

Bessaguet, F., and Desmoulière, A. (2021). Le foie. *Actual. Pharm.* 60, 57–61.

Beutler, B., Eidenschenk, C., Crozat, K., Imler, J.-L., Takeuchi, O., Hoffmann, J.A., and Akira, S. (2007). Genetic analysis of resistance to viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 753–766.

Black, M. (1980). Acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology* 78, 382–392.

Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2006). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 440, 808–812.

Blasius, A.L., and Beutler, B. (2010). Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32, 305–315.

Blériot, C., Dupuis, T., Jouvion, G., Eberl, G., Disson, O., and Lecuit, M. (2015). Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection. *Immunity* 42, 145–158.

Bonnardel, J., T’Jonck, W., Gaublomme, D., Browaeys, R., Scott, C.L., Martens, L., Vanneste, B., De Prijck, S., Nedospasov, S.A., Kremer, A., et al. (2019). Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity* 51, 638-654.e9.

Bosschaerts, T., Guilliams, M., Stijlemans, B., Morias, Y., Engel, D., Tacke, F., Hérin, M., Baetselier, P.D., and Beschin, A. (2010). Tip-DC Development during Parasitic Infection Is Regulated by IL-10 and Requires CCL2/CCR2, IFN- γ and MyD88 Signaling. *PLOS Pathog.* 6, e1001045.

Boyd, E.M., and Berezky, G.M. (1966). Liver necrosis from paracetamol. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 26, 606–614.

Boyd, E.M., and Hogan, S.E. (1968). The chronic oral toxicity of paracetamol at the range of the LD50 (100 days) in albino rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 46, 239–245.

Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342.

Breous, E., Somanathan, S., Vandenberghe, L.H., and Wilson, J.M. (2009). Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance

to antigens targeting murine liver. *Hepatology*. Baltimore, Md 50, 612–621.

Bruttger, J., Karam, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., Klein, M., Blank, T., Yona, S., Wolf, Y., et al. (2015). Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* 43, 92–106.

Calderon, B., Carrero, J.A., Ferris, S.T., Sojka, D.K., Moore, L., Epelman, S., Murphy, K.M., Yokoyama, W.M., Randolph, G.J., and Unanue, E.R. (2015). The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages. *J. Exp. Med.* 212, 1497–1512.

Campion, S.N., Johnson, R., Aleksunes, L.M., Goedken, M.J., van Rooijen, N., Scheffer, G.L., Cherrington, N.J., and Manautou, J.E. (2008). Hepatic Mrp4 induction following acetaminophen exposure is dependent on Kupffer cell function. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G294–304.

Carlin, L.M., Stamatiades, E.G., Auffray, C., Hanna, R.N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C.C., Cook, H.T., Diebold, S., and Geissmann, F. (2013). Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153, 362–375.

Cecchini, M.G., Dominguez, M.G., Mocci, S., Wetterwald, A., Felix, R., Fleisch, H., Chisholm, O., Hofstetter, W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1994). Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 120, 1357–1372.

Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., et al. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 4, 702–707.

Chastre, A., Bélanger, M., Beauchesne, E., Nguyen, B.N., Desjardins, P., and Butterworth, R.F. (2012). Inflammatory Cascades Driven by Tumor Necrosis Factor-Alpha Play a Major Role in the Progression of Acute Liver Failure and Its Neurological Complications. *PLoS ONE* 7, e49670.

Chen, Z.J. (2012). Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol. Rev.* 246, 95–106.

Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K.J., Chambon, P., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Barbaroux, J.-B., Groves, R., and Geissmann, F. (2009). Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J. Exp. Med.* 206, 3089–3100.

Chow, A., Lucas, D., Hidalgo, A., Méndez-Ferrer, S., Hashimoto, D., Scheiermann, C., Battista, M., Leboeuf, M., Prophete, C., van Rooijen, N., et al. (2011). Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J. Exp. Med.* 208, 261–271.

Clària, J., Stauber, R.E., Coenraad, M.J., Moreau, R., Jalan, R., Pavesi, M., Amorós, À., Titos, E., Alcaraz-Quiles, J., Oettl, K., et al. (2016). Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology*. Baltimore, Md 64, 1249–1264.

Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332, 1519–1523.

Corcoran, G., Mitchell, J., Vaishnav, Y., and Horning, E. (1980). Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Mol. Pharmacol.* 18, 536–542.

Crispe, I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 147–163.

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., et al. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375–386.

Croxford, A.L., Lanzinger, M., Hartmann, F.J., Schreiner, B., Mair, F., Pelczar, P., Clausen, B.E., Jung, S., Greter, M., and Becher, B. (2015). The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2⁺ Monocytes and Licenses Autoimmunity. *Immunity* 43, 502–514.

Dadoune, Hadjiisky, Si, and Dadoune, J.-P. (2000). *Histologie*, 2e édition (Flammarion).

Daemen, S., Gainullina, A., Kalugotla, G., He, L., Chan, M.M., Beals, J.W., Liss, K.H., Klein, S., Feldstein, A.E., Finck, B.N., et al. (2021). Dynamic Shifts in the Composition of Resident and Recruited Macrophages Influence Tissue Remodeling in NASH. *Cell Rep.* 34, 108626.

Dai, X.-M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111–120.

Davidson, D.G., and Eastham, W.N. (1966). Acute liver necrosis following overdose of paracetamol. *Br. Med. J.* 2, 497–499.

Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995.

Davis, D.C., Potter, W.Z., Jollow, D.J., and Mitchell, J.R. (1974). Species differences in hepatic glutathione depletion, covalent binding and hepatic necrosis after acetaminophen. *Life Sci.* 14, 2099–2109.

Decker, K., and Keppler, D. (1974). Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev. Physiol.*

Biochem. Pharmacol. 77–106.

Delneste, Y., Beauvillain, C., and Jeannin, P. (2007). [Innate immunity: structure and function of TLRs]. *Med. Sci. MS* 23, 67–73.

Deppermann, C., Kratofil, R.M., Peiseler, M., David, B.A., Zindel, J., Castanheira, F.V.E.S., van der Wal, F., Carestia, A., Jenne, C.N., Marth, J.D., et al. (2020). Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets. *J. Exp. Med.* 217, e20190723.

Devisscher, L., Scott, C.L., Lefere, S., Raevens, S., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., Geerts, A., Guilliams, M., and Van Vlierberghe, H. (2017). Non-alcoholic steatohepatitis induces transient changes within the liver macrophage pool. *Cell. Immunol.* 322, 74–83.

Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and Parks, E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* 115, 1343–1351.

Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., and Sibley, L.D. (2008). Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306–317.

Eckert, C., Klein, N., Kornek, M., and Lukacs-Kornek, V. (2015). The complex myeloid network of the liver with diverse functional capacity at steady state and in inflammation. *Front. Immunol.* 6, 179.

Ehrlich, A., Duche, D., Ouedraogo, G., and Nahmias, Y. (2019). Challenges and Opportunities in the Design of Liver-on-Chip Microdevices. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 21, 219–239.

Ekstedt, M., Hagström, H., Nasr, P., Fredrikson, M., Stål, P., Kechagias, S., and Hultcrantz, R. (2015). Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 61, 1547–1554.

Emmanuilidis, K., Weighardt, H., Maier, S., Gerauer, K., Fleischmann, T., Zheng, X.X., Hancock, W.W., Holzmann, B., and Heidecke, C.D. (2001). Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. *J. Immunol. Baltimore* 167, 3919–3927.

Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brijja, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014a). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40, 91–104.

Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014b). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21–35.

Eslam, M., Sanyal, A.J., George, J., and International Consensus Panel (2020).

MAFLD: A Consensus-Driven Proposed Nomenclature for Metabolic Associated Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 158, 1999-2014.e1.

Estes, C., Anstee, Q.M., Arias-Loste, M.T., Bantel, H., Bellentani, S., Caballeria, J., Colombo, M., Craxi, A., Crespo, J., Day, C.P., et al. (2018). Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J. Hepatol.* 69, 896–904.

Feinberg, M.W., Wara, A.K., Cao, Z., Lebedeva, M.A., Rosenbauer, F., Iwasaki, H., Hirai, H., Katz, J.P., Haspel, R.L., Gray, S., et al. (2007). The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J.* 26, 4138–4148.

Feldstein, A.E., Canbay, A., Angulo, P., Taniai, M., Burgart, L.J., Lindor, K.D., and Gores, G.J. (2003). Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 125, 437–443.

Fernández, J., Acevedo, J., Wiest, R., Gustot, T., Amoros, A., Deulofeu, C., Reverter, E., Martínez, J., Saliba, F., Jalan, R., et al. (2018). Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: prevalence, characteristics and impact on prognosis. *Gut* 67, 1870–1880.

Fernández, J., Clària, J., Amorós, A., Aguilar, F., Castro, M., Casulleras, M., Acevedo, J., Duran-Güell, M., Nuñez, L., Costa, M., et al. (2019). Effects of Albumin Treatment on Systemic and Portal Hemodynamics and Systemic Inflammation in Patients With Decompensated Cirrhosis. *Gastroenterology* 157, 149–162.

Fife, B.T., Huffnagle, G.B., Kuziel, W.A., and Karpus, W.J. (2000). CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 192, 899–905.

del Fresno, C., Iborra, S., Saz-Leal, P., Martínez-López, M., and Sancho, D. (2018). Flexible Signaling of Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Inflammation. *Front. Immunol.* 9, 804.

Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M., and Sanyal, A.J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 24, 908–922.

Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat. Immunol.* 7, 1250–1257.

van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., and Langevoort, H.L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* 46, 845–852.

Galanos, C., Freudenberg, M.A., and Reutter, W. (1979). Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5939–5943.

Gamrekelashvili, J., Giagnorio, R., Jussofie, J., Soehnlein, O., Duchene, J., Briseño, C.G., Ramasamy, S.K., Krishnasamy, K., Limbourg, A., Kapanadze, T., et al. (2016). Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nat. Commun.* 7, 12597.

Gandoura, S., Weiss, E., Rautou, P.-E., Fasseu, M., Gustot, T., Lemoine, F., Hurtado-Nedelec, M., Hego, C., Vadrot, N., Elkrief, L., et al. (2013). Gene- and exon-expression profiling reveals an extensive LPS-induced response in immune cells in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.* 58, 936–948.

Ganz, M., Bukong, T.N., Csak, T., Saha, B., Park, J.-K., Ambade, A., Kodys, K., and Szabo, G. (2015). Progression of non-alcoholic steatosis to steatohepatitis and fibrosis parallels cumulative accumulation of danger signals that promote inflammation and liver tumors in a high fat-cholesterol-sugar diet model in mice. *J. Transl. Med.* 13, 193.

Gaskell, H., Ge, X., and Nieto, N. (2018). High-Mobility Group Box-1 and Liver Disease. *Hepatol. Commun.* 2, 1005–1020.

Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 13, 1118–1128.

Gautier, E.L., Ivanov, S., Lesnik, P., and Randolph, G.J. (2013). Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood* 122, 2714–2722.

Gebhardt, A., Laudenbach, B.T., and Pichlmair, A. (2017). Discrimination of Self and Non-Self Ribonucleic Acids. *J. Interferon Cytokine Res.* 37, 184–197.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.

Gentek, R., Molawi, K., and Sieweke, M.H. (2014). Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol. Rev.* 262, 56–73.

Gibbins, S.L., Goyal, R., Desch, A.N., Leach, S.M., Prabagar, M., Atif, S.M., Bratton, D.L., Janssen, W., and Jakubzick, C.V. (2015). Transcriptome analysis highlights the conserved difference between embryonic and postnatal-derived alveolar macrophages. *Blood* 126, 1357–1366.

Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016a). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449.

Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016b). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* 44, 439–449.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.

Gola, A., Dorrington, M.G., Speranza, E., Sala, C., Shih, R.M., Radtke, A.J., Wong, H.S., Baptista, A.P., Hernandez, J.M., Castellani, G., et al. (2021). Commensal-driven immune zonation of the liver promotes host defence. *Nature* 589, 131–136.

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., et al. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518, 547–551.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 953–964.

Gow, D.J., Sauter, K.A., Pridans, C., Moffat, L., Sehgal, A., Stutchfield, B.M., Raza, S., Beard, P.M., Tsai, Y.T., Bainbridge, G., et al. (2014). Characterisation of a novel Fc conjugate of macrophage colony-stimulating factor. *Mol. Ther.* 22, 1580–1592.

Graubardt, N., Vugman, M., Mouhadeb, O., Caliari, G., Pasmanik-Chor, M., Reuveni, D., Zigmund, E., Brazowski, E., David, E., Chappell-Maor, L., et al. (2017). Ly6Chi Monocytes and Their Macrophage Descendants Regulate Neutrophil Function and Clearance in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Front. Immunol.* 8, 626.

Greter, M., Lelios, I., and Croxford, A.L. (2015). Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front. Immunol.* 6, 249.

Guiducci, C., Gong, M., Cepika, A.-M., Xu, Z., Tripodo, C., Bennett, L., Crain, C., Quartier, P., Cush, J.J., Pascual, V., et al. (2013). RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 210, 2903–2919.

Guilliams, M., Movahedi, K., Bosschaerts, T., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Hérin, M., Acosta-Sanchez, A., Ma, L., Moser, M., Ginderachter, J.A.V., et al. (2009). IL-10 Dampens TNF/Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cell-Mediated Pathogenicity during Parasitic Infection. *J. Immunol.* 182, 1107–1118.

Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* 210, 1977–1992.

Guilliams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018a). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49, 595–613.

Guilliams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018b). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49, 595–613.

Guilliams, M., Thierry, G.R., Bonnardel, J., and Bajenoff, M. (2020). Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* 52, 434–451.

Gujral, J.S., Knight, T.R., Farhood, A., Bajt, M.L., and Jaeschke, H. (2002). Mode of Cell Death after Acetaminophen Overdose in Mice: Apoptosis or Oncotic Necrosis? *Toxicol. Sci.* 67, 322–328.

Guo, J., and Friedman, S.L. (2010). Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 3, 21.

Habich, C., Baumgart, K., Kolb, H., and Burkart, V. (2002). The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 569–576.

Haldar, M., and Murphy, K.M. (2014). Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunol. Rev.* 262, 25–35.

Hammam, O., Mahmoud, O., Zahran, M., Aly, S., Hosny, K., Helmy, A., and Anas, A. (2012). The Role of Fas/Fas Ligand System in the Pathogenesis of Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *Hepat. Mon.* 12, e6132.

Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat. Immunol.* 12, 778–785.

Hansen, H.H., Feigh, M., Veidal, S.S., Rigbolt, K.T., Vrang, N., and Fosgerau, K. (2017). Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis in preclinical drug development. *Drug Discov. Today* 22, 1707–1718.

Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.

Heard, K., Green, J.L., Bailey, J.E., Bogdan, G.M., and Dart, R.C. (2007). A randomized trial to determine the change in alanine aminotransferase during 10 days of paracetamol (acetaminophen) administration in subjects who consume moderate amounts of alcohol. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26, 283–290.

Heller, J., Sogni, P., Barrière, E., Tazi, K.A., Chauvelot-Moachon, L., Guimont, M.C., Bories, P.N., Poirel, O., Moreau, R., and Lebrec, D. (2000). Effects of lipopolysaccharide on TNF- α production, hepatic NOS2 activity, and hepatic toxicity in rats with cirrhosis. *J. Hepatol.* 33, 376–381.

Helmy, K.Y., Katschke, K.J., Gorgani, N.N., Kljavin, N.M., Elliott, J.M., Diehl, L., Scales, S.J., Ghilardi, N., and van Lookeren Campagne, M. (2006). CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124, 915–927.

Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat. Immunol.* 14, 821–830.

- Hibbs, M., Quilici, C., Kountouri, N., Seymour, J., Armes, J., Burgess, A., and Dunn, A. (2007). Mice Lacking Three Myeloid Colony-Stimulating Factors (G-CSF, GM-CSF, and M-CSF) Still Produce Macrophages and Granulocytes and Mount an Inflammatory Response in a Sterile Model of Peritonitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 6435–6443.
- Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front. Immunol.* *6*, 486.
- Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2018). Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell. Immunol.* *330*, 5–15.
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., et al. (2015). C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* *42*, 665–678.
- Horst, A.K., Neumann, K., Diehl, L., and Tiegs, G. (2016). Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell. Mol. Immunol.* *13*, 277–292.
- Huang, Q.-Q., and Pope, R.M. (2009). The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* *11*, 357–364.
- Huang, W., Metlakunta, A., Dedousis, N., Zhang, P., Sipula, I., Dube, J.J., Scott, D.K., and O’Doherty, R.M. (2010). Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* *59*, 347–357.
- Huby, T., and Gautier, E.L. (2021). Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis. *Nat. Rev. Immunol.* 1–15.
- Huffman, J.A., Hull, W.M., Dranoff, G., Mulligan, R.C., and Whitsett, J.A. (1996). Pulmonary epithelial cell expression of GM-CSF corrects the alveolar proteinosis in GM-CSF-deficient mice. *J. Clin. Invest.* *97*, 649–655.
- Hussell, T., and Bell, T.J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 81–93.
- Im, Y.R., Hunter, H., de Gracia Hahn, D., Duret, A., Cheah, Q., Dong, J., Fairey, M., Hjalmarsson, C., Li, A., Lim, H.K., et al. (2021). A Systematic Review of Animal Models of NAFLD Finds High-Fat, High-Fructose Diets Most Closely Resemble Human NAFLD. *Hepatol. Baltim. Md* *74*, 1884–1901.
- Imajo, K., Fujita, K., Yoneda, M., Nozaki, Y., Ogawa, Y., Shinohara, Y., Kato, S., Mawatari, H., Shibata, W., Kitani, H., et al. (2012). Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metab.* *16*, 44–54.
- Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., et al. (2010). Comparison of gene

expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10-19.

Inohara, N., Chamaillard, McDonald, C., and Nunez, G. (2005). NOD-LRR proteins: Role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 355–383.

Italiani, P., and Boraschi, D. (2017). Development and Functional Differentiation of Tissue-Resident Versus Monocyte-Derived Macrophages in Inflammatory Reactions. *Results Probl. Cell Differ.* 62, 23–43.

Itoh, M., Kato, H., Suganami, T., Konuma, K., Marumoto, Y., Terai, S., Sakugawa, H., Kanai, S., Hamaguchi, M., Fukaishi, T., et al. (2013). Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One* 8, e82163.

Izikson, L., Klein, R., Luster, A., and Weiner, H. (2002). Targeting Monocyte Recruitment in CNS Autoimmune Disease. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 103, 125–131.

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39, 599–610.

Jalan, R., and Williams, R. (2002). Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood Purif.* 20, 252–261.

Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., and Allen, J.E. (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332, 1284–1288.

Jiang, Z., Jiang, J.X., and Zhang, G.-X. (2014). Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol. Lett.* 160, 17–22.

Jollow, D.J., Thorgeirsson, S.S., Potter, W.Z., Hashimoto, M., and Mitchell, J.R. (1974). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. VI. Metabolic disposition of toxic and nontoxic doses of acetaminophen. *Pharmacology* 12, 251–271.

Ju, C., Reilly, T.P., Bourdi, M., Radonovich, M.F., Brady, J.N., George, J.W., and Pohl, L.R. (2002). Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1504–1513.

Kagan, J.C. (2012). Signaling Organelles of the Innate Immune System. *Cell* 151, 1168–1178.

Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M., and Núñez, G. (2007). Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 27, 549–559.

Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura,

T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., et al. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19–28.

Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J. Exp. Med.* 205, 1601–1610.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.

Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650.

Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 5, 461.

Kim, K.-W., Zhang, N., Choi, K., and Randolph, G.J. (2016). Homegrown Macrophages. *Immunity* 45, 468–470.

Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Uchida, Y., and Toge, T. (2004). The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. *Cancer* 100, 2281–2291.

King, I.L., Dickendesher, T.L., and Segal, B.M. (2009). Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113, 3190–3197.

Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L.D., Galán, J.E., Núñez, G., Janeway, C.A., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2002). RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 416, 194–199.

Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318–321.

Kollewe, C., Mackensen, A.-C., Neumann, D., Knop, J., Cao, P., Li, S., Wesche, H., and Martin, M.U. (2004). Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 5227–5236.

Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. (2011). IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.* 12, 231–238.

Krenkel, O., and Tacke, F. (2017). Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 306–321.

Kubes, P., and Jenne, C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annu. Rev.*

Immunol. 36, 247–277.

Kurotaki, D., Osato, N., Nishiyama, A., Yamamoto, M., Ban, T., Sato, H., Nakabayashi, J., Umehara, M., Miyake, N., Matsumoto, N., et al. (2013). Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* 121, 1839–1849.

van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., 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, 755–768.

Lai, S.M., Sheng, J., Gupta, P., Renia, L., Duan, K., Zolezzi, F., Karjalainen, K., Newell, E.W., and Ruedl, C. (2018). Organ-Specific Fate, Recruitment, and Refilling Dynamics of Tissue-Resident Macrophages during Blood-Stage Malaria. *Cell Rep.* 25, 3099-3109.e3.

Lancaster, G.I., Langley, K.G., Berglund, N.A., Kammoun, H.L., Reibe, S., Estevez, E., Weir, J., Mellett, N.A., Pernes, G., Conway, J.R.W., et al. (2018). Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metab.* 27, 1096-1110.e5.

Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* 159, 1312–1326.

Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., and Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 731–744.

Li, L., Duan, C., Zhao, Y., Zhang, X., Yin, H., Wang, T., Huang, C., Liu, S., Yang, S., and Li, X. (2017). Preventive effects of interleukin-6 in lipopolysaccharide/d-galactosamine induced acute liver injury via regulating inflammatory response in hepatic macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 51, 99–106.

Li, Y., Esain, V., Teng, L., Xu, J., Kwan, W., Frost, I.M., Yzaguirre, A.D., Cai, X., Cortes, M., Maijenburg, M.W., et al. (2014). Inflammatory signaling regulates embryonic hematopoietic stem and progenitor cell production. *Genes Dev.* 28, 2597–2612.

Liao, F., Andalibi, A., deBeer, F.C., Fogelman, A.M., and Lusis, A.J. (1993). Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J. Clin. Invest.* 91, 2572–2579.

Lin, Q., Yang, X.P., Fang, D., Ren, X., Zhou, H., Fang, J., Liu, X., Zhou, S., Wen, F., Yao, X., et al. (2011). High-mobility group box-1 mediates toll-like receptor 4-dependent angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1024–1032.

Lin, S.-C., Lo, Y.-C., and Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465, 885–890.

Luedde, T., Beraza, N., Kotsikoris, V., van Loo, G., Nenci, A., De Vos, R., Roskams,

- T., Trautwein, C., and Pasparakis, M. (2007). Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 11, 119–132.
- Ma, X., Lin, W.Y., Chen, Y., Stawicki, S., Mukhyala, K., Wu, Y., Martin, F., Bazan, J.F., and Starovasnik, M.A. (2012). Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Struct. Lond. Engl.* 20, 676–687.
- Machado, M.V., Michelotti, G.A., Xie, G., Almeida Pereira, T., de Almeida, T.P., Boursier, J., Bohnic, B., Guy, C.D., and Diehl, A.M. (2015). Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PloS One* 10, e0127991.
- Machiels, B., Dourcy, M., Xiao, X., Javaux, J., Mesnil, C., Sabatel, C., Desmecht, D., Lallemand, F., Martinive, P., Hammad, H., et al. (2017). A gammaherpesvirus provides protection against allergic asthma by inducing the replacement of resident alveolar macrophages with regulatory monocytes. *Nat. Immunol.* 18, 1310–1320.
- Makkar, S., Riehl, T.E., Chen, B., Yan, Y., Alvarado, D.M., Ciorba, M.A., and Stenson, W.F. (2019). Hyaluronic acid binding to TLR4 promotes proliferation and blocks apoptosis in colon cancer. *Mol. Cancer Ther.* 18, 2446–2456.
- Malarkey, D.E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., and Maronpot, R.R. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol. Pathol.* 33, 27–34.
- Malhi, H., and Kaufman, R.J. (2011). Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J. Hepatol.* 54, 795–809.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., Ito, T., Katsume, A., and Sudoh, M. (2013). An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int. J. Exp. Pathol.* 94, 93–103.
- McGill, M.R., Sharpe, M.R., Williams, C.D., Taha, M., Curry, S.C., and Jaeschke, H. (2012). The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J. Clin. Invest.* 122, 1574–1583.
- McQualter, J.L., Darwiche, R., Ewing, C., Onuki, M., Kay, T.W., Hamilton, J.A., Reid, H.H., and Bernard, C.C. (2001). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 194, 873–882.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442, 39–44.

Michaud, J.-P., Bellavance, M.-A., Préfontaine, P., and Rivest, S. (2013). Real-time in vivo imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. *Cell Rep.* *5*, 646–653.

Mignon, A., Rouquet, N., Fabre, M., Martin, S., Pagès, J.C., Dhainaut, J.F., Kahn, A., Briand, P., and Joulin, V. (1999). LPS challenge in D-galactosamine-sensitized mice accounts for caspase-dependent fulminant hepatitis, not for septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *159*, 1308–1315.

Mildner, A., Mack, M., Schmidt, H., Brück, W., Djukic, M., Zabel, M.D., Hille, A., Priller, J., and Prinz, M. (2009). CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain J. Neurol.* *132*, 2487–2500.

Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul, F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., et al. (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP β Transcription Factor Dependence of Ly6C⁺ Cells. *Immunity* *46*, 849-862.e7.

Modica, S., Bellafante, E., and Moschetta, A. (2009). Master regulation of bile acid and xenobiotic metabolism via the FXR, PXR and CAR trio. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *14*, 4719–4745.

Mohandas, J., Duggin, G.G., Horvath, J.S., and Tiller, D.J. (1981). Metabolic oxidation of acetaminophen (Paracetamol) mediated by cytochrome P-450 mixed-function oxidase and prostaglandin endoperoxide synthetase in rabbit kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *61*, 252–259.

Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P.K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A.R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., et al. (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* *211*, 2151–2158.

Moreno, S.G. (2018). Depleting Macrophages In Vivo with Clodronate-Liposomes. In *Macrophages*, (Humana Press, New York, NY), pp. 259–262.

Mossadegh-Keller, N., Gentek, R., Gimenez, G., Bigot, S., Mailfert, S., and Sieweke, M.H. (2017). Developmental origin and maintenance of distinct testicular macrophage populations. *J. Exp. Med.* *214*, 2829–2841.

Muller, P.A., Koscsó, B., Rajani, G.M., Stevanovic, K., Berres, M.-L., Hashimoto, D., Mortha, A., Leboeuf, M., Li, X.-M., Mucida, D., et al. (2014). Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* *158*, 300–313.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 723–737.

Nagareddy, P.R., Kraakman, M., Masters, S.L., Stirzaker, R.A., Gorman, D.J., Grant, R.W., Dragoljevic, D., Hong, E.S., Abdel-Latif, A., Smyth, S.S., et al. (2014). Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity. *Cell Metab.* *19*, 821–835.

- Nowak, M., Gaines, G.C., Rosenberg, J., Minter, R., Bahjat, F.R., Rectenwald, J., MacKay, S.L., Edwards, C.K., and Moldawer, L.L. (2000). LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *278*, R1202-1209.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* *364*, 806–809.
- Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* *411*, 603–606.
- Oh, D.Y., Morinaga, H., Talukdar, S., Bae, E.J., and Olefsky, J.M. (2012). Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes* *61*, 346–354.
- O'Hara, J., Finnegan, A., Dhillon, H., Ruiz-Casas, L., Pedra, G., Franks, B., Morgan, G., Hebditch, V., Jönsson, B., Mabhala, M., et al. (2020). Cost of non-alcoholic steatohepatitis in Europe and the USA: The GAIN study. *JHEP Rep. Innov. Hepatol.* *2*, 100142.
- Oishi, Y., and Manabe, I. (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int. Immunol.* *30*, 511–528.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 453–460.
- Pais, R., Barritt, A.S., Calmus, Y., Scatton, O., Runge, T., Lebray, P., Poynard, T., Ratziu, V., and Conti, F. (2016). NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *J. Hepatol.* *65*, 1245–1257.
- Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., Ray, S., Majumdar, S.S., and Bhattacharya, S. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med.* *18*, 1279–1285.
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.-B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* *155*, 1596–1609.
- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* *74*, 2527–2534.
- Patel, A.A., Zhang, Y., Fullerton, J.N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A.A., Bigley, V., Flavell, R.A., Gilroy, D.W., Asquith, B., et al. (2017). The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* *214*, 1913–1923.
- Possamai, L.A., McPhail, M.J.W., Quaglia, A., Zingarelli, V., Abeles, R.D., Tidswell, R., Puthuchery, Z., Rawal, J., Karvellas, C.J., Leslie, E.M., et al. (2013). Character and

temporal evolution of apoptosis in acetaminophen-induced acute liver failure*. *Crit. Care Med.* *41*, 2543–2550.

Pridans, C., Raper, A., Davis, G.M., Alves, J., Sauter, K.A., Lefevre, L., Regan, T., Meek, S., Sutherland, L., Thomson, A.J., et al. (2018a). Pleiotropic Impacts of Macrophage and Microglial Deficiency on Development in Rats with Targeted Mutation of the *Csf1r* Locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *201*, 2683–2699.

Pridans, C., Sauter, K.A., Irvine, K.M., Davis, G.M., Lefevre, L., Raper, A., Rojo, R., Nirmal, A.J., Beard, P., Cheeseman, M., et al. (2018b). Macrophage colony-stimulating factor increases hepatic macrophage content, liver growth, and lipid accumulation in neonatal rats. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *314*, G388–G398.

Racanelli, V., and Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology*. *Baltim. Md* *43*, S54-62.

Rehwinkel, J., and Gack, M.U. (2020). RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat. Rev. Immunol.* *20*, 537–551.

Reid, D.T., Reyes, J.L., McDonald, B.A., Vo, T., Reimer, R.A., and Eksteen, B. (2016). Kupffer Cells Undergo Fundamental Changes during the Development of Experimental NASH and Are Critical in Initiating Liver Damage and Inflammation. *PLoS ONE* *11*.

Remmerie, A., Martens, L., Thoné, T., Castoldi, A., Seurinck, R., Pavie, B., Roels, J., Vanneste, B., De Prijck, S., Vanhockerhout, M., et al. (2020). Osteopontin Expression Identifies a Subset of Recruited Macrophages Distinct from Kupffer Cells in the Fatty Liver. *Immunity* *53*, 641-657.e14.

Reuben, A., Tillman, H., Fontana, R.J., Davern, T., McGuire, B., Stravitz, R.T., Durkalski, V., Larson, A.M., Liou, I., Fix, O., et al. (2016). Outcomes in Adults With Acute Liver Failure Between 1998 and 2013: An Observational Cohort Study. *Ann. Intern. Med.* *164*, 724–732.

Robbins, C.S., Chudnovskiy, A., Rauch, P.J., Figueiredo, J.-L., Iwamoto, Y., Gorbатов, R., Etzrodt, M., Weber, G.F., Ueno, T., van Rooijen, N., et al. (2012). Extramedullary Hematopoiesis Generates Ly-6Chigh Monocytes That Infiltrate Atherosclerotic Lesions. *Circulation* *125*, 364–374.

Rolot, M., M Dougall, A., Javaux, J., Lallemand, F., Machiels, B., Martinive, P., Gillet, L., and Dewals, B.G. (2019). Recruitment of hepatic macrophages from monocytes is independent of IL-4R α but is associated with ablation of resident macrophages in schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.* *49*, 1067–1081.

Sakai, M., Troutman, T.D., Seidman, J.S., Ouyang, Z., Spann, N.J., Abe, Y., Ego, K.M., Bruni, C.M., Deng, Z., Schlachetzki, J.C.M., et al. (2019). Liver-Derived Signals Sequentially Reprogram Myeloid Enhancers to Initiate and Maintain Kupffer Cell Identity. *Immunity* *51*, 655-670.e8.

Sancho, D., and Reis e Sousa, C. (2013). Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* *25*, 46–52.

Saxena, M., and Yeretssian, G. (2014). NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* 5, 327.

Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705.

Schattenberg, J.M., Lazarus, J.V., Newsome, P.N., Serfaty, L., Aghemo, A., Augustin, S., Tsochatzis, E., de Ledinghen, V., Bugianesi, E., Romero-Gomez, M., et al. (2021). Disease burden and economic impact of diagnosed non-alcoholic steatohepatitis in five European countries in 2018: A cost-of-illness analysis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 41, 1227–1242.

Schwabe, R.F., and Luedde, T. (2018). Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 738–752.

Scott, C.L., Zheng, F., De Baetselier, P., Martens, L., Saeys, Y., De Prijck, S., Lippens, S., Abels, C., Schoonooghe, S., Raes, G., et al. (2016). Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat. Commun.* 7.

Scott, C.L., T'Jonck, W., Martens, L., Todorov, H., Sichien, D., Soen, B., Bonnardel, J., De Prijck, S., Vandamme, N., Cannoodt, R., et al. (2018). The Transcription Factor ZEB2 Is Required to Maintain the Tissue-Specific Identities of Macrophages. *Immunity* 49, 312-325.e5.

Seidman, J.S., Troutman, T.D., Sakai, M., Gola, A., Spann, N.J., Bennett, H., Bruni, C.M., Ouyang, Z., Li, R.Z., Sun, X., et al. (2020). Niche-Specific Reprogramming of Epigenetic Landscapes Drives Myeloid Cell Diversity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 52, 1057-1074.e7.

Sendensky, A., and Dufour, J.-F. (2011). *Liver Physiology*. pp. 33–45.

Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A., and Pamer, E.G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59–70.

Shaw, T.N., Houston, S.A., Wemyss, K., Bridgeman, H.M., Barbera, T.A., Zangerle-Murray, T., Strangward, P., Ridley, A.J.L., Wang, P., Tamoutounour, S., et al. (2018). Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *J. Exp. Med.*

Shemer, A., Erny, D., Jung, S., and Prinz, M. (2015). Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective. *Trends Immunol.* 36, 614–624.

Sheng, J., Ruedl, C., and Karjalainen, K. (2015a). Fetal HSCs versus EMP2s. *Immunity* 43, 1025.

Sheng, J., Ruedl, C., and Karjalainen, K. (2015b). Most Tissue-Resident Macrophages

Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 43, 382–393.

Shetty, S., Lalor, P.F., and Adams, D.H. (2018). Liver sinusoidal endothelial cells — gatekeepers of hepatic immunity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 555–567.

Sieweke, M.H., and Allen, J.E. (2013). Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 342, 1242974.

Singer, G.G., Carrera, A.C., Marshak-Rothstein, A., Martínez-A, C., and Abbas, A.K. (1994). Apoptosis, fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 913–920.

Slater, L., Bartlett, N.W., Haas, J.J., Zhu, J., Message, S.D., Walton, R.P., Sykes, A., Dahdaleh, S., Clarke, D.L., Belvisi, M.G., et al. (2010). Co-ordinated Role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the Innate Response to Rhinovirus in Bronchial Epithelium. *PLOS Pathog.* 6, e1001178.

Softic, S., Cohen, D.E., and Kahn, C.R. (2016). Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* 61, 1282–1293.

Soucie, E.L., Weng, Z., Geirsdóttir, L., Molawi, K., Maurizio, J., Fenouil, R., Mossadegh-Keller, N., Gimenez, G., VanHille, L., Beniazza, M., et al. (2016). Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells. *Science* 351, aad5510.

Steinberg, A.D. (1994). MRL-lpr/lpr disease: theories meet Fas. *Semin. Immunol.* 6, 55–69.

Streetz, K.L., Wüstefeld, T., Klein, C., Manns, M.P., and Trautwein, C. (2001). Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.* 47, 661–673.

Surewaard, B.G.J., Deniset, J.F., Zemp, F.J., Amrein, M., Otto, M., Conly, J., Omri, A., Yates, R.M., and Kubes, P. (2016). Identification and treatment of the *Staphylococcus aureus* reservoir in vivo. *J. Exp. Med.* 213, 1141–1151.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612–616.

Takemura, N., Kawasaki, T., Kunisawa, J., Sato, S., Lamichhane, A., Kobiyama, K., Aoshi, T., Ito, J., Mizuguchi, K., Karuppuchamy, T., et al. (2014). Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nat. Commun.* 5, 3492.

Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 104–116.

Tamoutounour, S., Henri, S., Lelouard, H., de Bovis, B., de Haar, C., van der Woude, C.J., Woltman, A.M., Reyat, Y., Bonnet, D., Sichien, D., et al. (2012). CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur. J. Immunol.* 42, 3150–3166.

Tamoutounour, S., Williams, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938.

Tamura, A., Hirai, H., Yokota, A., Kamio, N., Sato, A., Shoji, T., Kashiwagi, T., Torikoshi, Y., Miura, Y., Tenen, D.G., et al. (2017). C/EBP β is required for survival of Ly6C⁺ monocytes. *Blood* 130, 1809–1818.

Taylor, R.M., Tujios, S., Jinjuvadia, K., Davern, T., Shaikh, O.S., Han, S., Chung, R.T., Lee, W.M., and Fontana, R.J. (2012). Short and long-term outcomes in patients with acute liver failure due to ischemic hepatitis. *Dig. Dis. Sci.* 57, 777–785.

Tazi, K.A., Quioc, J.-J., Saada, V., Bezeaud, A., Lebrec, D., and Moreau, R. (2006). Upregulation of TNF- α production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J. Hepatol.* 45, 280–289.

Tazi, K.A., Bièche, I., Paradis, V., Guichard, C., Laurendeau, I., Dargère, D., Legrand, A., Fay, M., Pedruzzi, E., Robin, M.-A., et al. (2007). In vivo altered unfolded protein response and apoptosis in livers from lipopolysaccharide-challenged cirrhotic rats. *J. Hepatol.* 46, 1075–1088.

Terry, R.L., and Miller, S.D. (2014). Molecular control of monocyte development. *Cell. Immunol.* 291, 16–21.

Thabut, D., Tazi, K.A., Bonnefont-Rousselot, D., Aller, M., Farges, O., Guimont, M.-C., Tellier, Z., Guichard, C., Ogier-Denis, E., Poynard, T., et al. (2007). High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology* 46, 1893–1906.

Theurl, I., Hilgendorf, I., Nairz, M., Tymoszuk, P., Haschka, D., Asshoff, M., He, S., Gerhardt, L.M.S., Holderried, T.A.W., Seifert, M., et al. (2016). On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. *Nat. Med.* 22, 945–951.

Theurl, M., Theurl, I., Hochegger, K., Obrist, P., Subramaniam, N., van Rooijen, N., Schuemann, K., and Weiss, G. (2008). Kupffer cells modulate iron homeostasis in mice via regulation of hepcidin expression. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 86, 825–835.

Thomas, E.D., Ramberg, R.E., Sale, G.E., Sparkes, R.S., and Golde, D.W. (1976). Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science* 192, 1016–1018.

Thomas, G.D., Hanna, R.N., Vasudevan, N.T., Hamers, A.A., Romanoski, C.E., McArdale, S., Ross, K., Blatchley, A., Yoakum, D., Hamilton, B.A., et al. (2016). Deleting an Nr4a1 super-enhancer subdomain ablates Ly6Clow monocytes while preserving macrophage gene function. *Immunity* 45, 975–987.

Ting, J.P.-Y., Lovering, R.C., Alnemri, E.S.Ph.D., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., et al. (2008). The NLR gene family: An official nomenclature. *Immunity* 28, 285–287.

Todoric, J., Di Caro, G., Reibe, S., Henstridge, D.C., Green, C.R., Vrbanac, A., Ceteci, F., Conche, C., McNulty, R., Shalapour, S., et al. (2020). Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation. *Nat. Metab.* 2, 1034–1045.

Tran, S., Baba, I., Poupel, L., Dussaud, S., Moreau, M., Gélinau, A., Marcelin, G., Magréau-Davy, E., Ouhachi, M., Lesnik, P., et al. (2020). Impaired Kupffer Cell Self-Renewal Alters the Liver Response to Lipid Overload during Non-alcoholic Steatohepatitis. *Immunity* 53, 627-640.e5.

Trautwein, C., and Koch, A. (2013). Mechanisms of Acute Liver Failure. *Liver Immunol.* 373–388.

Trez, C.D., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., and Muraille, E. (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 Pathog.* 5, e1000494.

Tso, P., and McGill, D. (2003). Physiology of the liver. p.

Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356, eaah4573.

Vlahos, R., and Bozinovski, S. (2014). Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Front. Immunol.* 5, 435.

Vuppalanchi, R., Nouredin, M., Alkhoury, N., and Sanyal, A.J. (2021). Therapeutic pipeline in nonalcoholic steatohepatitis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 373–392.

Wandrer, F., Liebig, S., Marhenke, S., Vogel, A., John, K., Manns, M.P., Teufel, A., Itzel, T., Longerich, T., Maier, O., et al. (2020). TNF-Receptor-1 inhibition reduces liver steatosis, hepatocellular injury and fibrosis in NAFLD mice. *Cell Death Dis.* 11, 1–9.

Wang, X., Cai, B., Yang, X., Sonubi, O.O., Zheng, Z., Ramakrishnan, R., Shi, H., Valenti, L., Pajvani, U.B., Sandhu, J., et al. (2020). Cholesterol Stabilizes TAZ in Hepatocytes to Promote Experimental Non-alcoholic Steatohepatitis. *Cell Metab.* 31, 969-986.e7.

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D.,

Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* *13*, 753–760.

Wang, Y., van der Tuin, S., Tjeerdema, N., van Dam, A.D., Rensen, S.S., Hendriks, T., Berbée, J.F.P., Atanasovska, B., Fu, J., Hoekstra, M., et al. (2015). Plasma cholesteryl ester transfer protein is predominantly derived from Kupffer cells. *Hepatology*. Baltimore, Md *62*, 1710–1722.

Wang, Y., Song, E., Bai, B., and Vanhoutte, P.M. (2016). Toll-like receptors mediating vascular malfunction: Lessons from receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* *158*, 91–100.

Waring, W.S. (2012). Novel acetylcysteine regimens for treatment of paracetamol overdose. *Ther. Adv. Drug Saf.* *3*, 305–315.

Webster, J.D., and Vucic, D. (2020). The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Front. Cell Dev. Biol.* *8*, 365.

Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4828–4832.

Willekens, F.L.A., Werre, J.M., Kruijt, J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder, B., Groenen-Döpp, Y.A.M., van den Bos, A.G., Bosman, G.J.C.G.M., and van Berkel, T.J.C. (2005). Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors. *Blood* *105*, 2141–2145.

Wlodarczyk, A., Cédile, O., Jensen, K.N., Jasson, A., Mony, J.T., Khorrooshi, R., and Owens, T. (2015). Pathologic and Protective Roles for Microglial Subsets and Bone Marrow- and Blood-Derived Myeloid Cells in Central Nervous System Inflammation. *Front. Immunol.* *6*, 463.

Wolf, A.M., Wolf, D., Rumpold, H., Ludwiczek, S., Enrich, B., Gastl, G., Weiss, G., and Tilg, H. (2005). The kinase inhibitor imatinib mesylate inhibits TNF- α production in vitro and prevents TNF-dependent acute hepatic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13622–13627.

Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., 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*, 549–564.

Wong, C.H.Y., Jenne, C.N., Petri, B., Chrobok, N.L., and Kubes, P. (2013). Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat. Immunol.* *14*, 785–792.

Woolbright, B.L., and Jaeschke, H. (2017). The impact of sterile inflammation in acute liver injury. *J. Clin. Transl. Res.* *3*, 170–188.

Woollard, K.J., and Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat. Rev. Cardiol.* 7, 77–86.

Xie, Y., McGill, M.R., Dorko, K., Kumer, S.C., Schmitt, T.M., Forster, J., and Jaeschke, H. (2014). Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 266–274.

Yamasaki, R., Lu, H., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A.M., Cialic, R., Wu, P.M., Doykan, C.E., Lin, J., Cotleur, A.C., et al. (2014). Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J. Exp. Med.* 211, 1533–1549.

Yáñez, A., Coetzee, S.G., Olsson, A., Muench, D.E., Berman, B.P., Hazelett, D.J., Salomonis, N., Grimes, H.L., and Goodridge, H.S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity* 47, 890-902.e4.

Yang, C.-Y., Chen, J.-B., Tsai, T.-F., Tsai, Y.-C., Tsai, C.-Y., Liang, P.-H., Hsu, T.-L., Wu, C.-Y., Netea, M.G., Wong, C.-H., 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, e65070.

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Williams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.

Yoneyama, M., Onomoto, K., Jogi, M., Akaboshi, T., and Fujita, T. (2015). Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 32, 48–53.

Yoshida, M., Ikegami, M., Reed, J.A., Chroneos, Z.C., and Whitsett, J.A. (2001). GM-CSF regulates protein and lipid catabolism by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 280, L379-386.

Younossi, Z.M., Blissett, D., Blissett, R., Henry, L., Stepanova, M., Younossi, Y., Racila, A., Hunt, S., and Beckerman, R. (2016a). The economic and clinical burden of nonalcoholic fatty liver disease in the United States and Europe. *Hepatology* 64, 1577–1586.

Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016b). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64, 73–84.

Yu, L., and Feng, Z. (2018). The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure. *Mediators Inflamm.* 2018, 9874109.

Zarembek, K.A., and Godowski, P.J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* 168, 554–561.

Zasłona, Z., Przybranowski, S., Wilke, C., van Rooijen, N., Teitz-Tennenbaum, S., Osterholzer, J.J., Wilkinson, J.E., Moore, B.B., and Peters-Golden, M. (2014). Resident alveolar macrophages suppress, whereas recruited monocytes promote, allergic lung inflammation in murine models of asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 4245–4253.

Zheng, X.-F., Hu, X.-Y., Ma, B., Fang, H., Zhang, F., Mao, Y.-F., Yang, F.-Y., Xiao, S.-C., and Xia, Z.-F. (2018). Interleukin-35 Attenuates D-Galactosamine/Lipopolysaccharide-Induced Liver Injury via Enhancing Interleukin-10 Production in Kupffer Cells. *Front. Pharmacol.* 9, 959.

Ziegler-Heitbrock, L. (2014). Monocyte subsets in man and other species. *Cell. Immunol.* 289, 135–139.

Zigmond, E., Varol, C., Farache, J., Elmaliyah, E., Satpathy, A.T., Friedlander, G., Mack, M., Shpigel, N., Boneca, I.G., Murphy, K.M., et al. (2012). Ly6C^{hi} monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* 37, 1076–1090.

Zigmond, E., Samia-Grinberg, S., Pasmanik-Chor, M., Brazowski, E., Shibolet, O., Halpern, Z., and Varol, C. (2014). Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 344–353.

Zwicker, C., Bujko, A., and Scott, C.L. (2021). Hepatic Macrophage Responses in Inflammation, a Function of Plasticity, Heterogeneity or Both? *Front. Immunol.* 12, 2179.