Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude des effets du miel Revamil® sur les macrophages dans l'inflammation : impact sur la biologie des mitochondries et des lysosomes

VERBEKE, Jeremy

Award date:
2018

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 04. May. 2026



Faculté des Sciences

ETUDE DES EFFETS DU MIEL REVAMIL® SUR LES MACROPHAGES DANS L'INFLAMMATION : IMPACT SUR LA BIOLOGIE DES MITOCHONDRIES ET DES LYSOSOMES

Mémoire présenté pour l'obtention

du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Jérémy VERBEKE

Janvier 2018

Université de Namur

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@unamur.be - http://www.unamur.be

Étude des effets du miel Revamil® sur les macrophages dans l'inflammation : impact sur la biologie des mitochondries et des lysosomes

VERBEKE Jérémy

Résumé

L'inflammation est un mécanisme complexe mais essentiel du système immunitaire inné des mammifères. Les macrophages représentent des acteurs clés dans les réponses inflammatoires et présentent une plasticité fonctionnelle différente en fonction du microenvironnement rencontré au niveau de la lésion. Les lysosomes et les mitochondries sont notamment impliqués dans les fonctions inflammatoires des macrophages au travers d'une reprogrammation métabolique et de réponses autophagiques. Parallèlement, de nombreuses études ont rapporté les effets anti-bactériens, anti-inflammatoires et immunomodulateurs du miel, mais ses effets putatifs sur les fonctions des lysosomes et des mitochondries dans un contexte inflammatoire ou non n'ont encore jamais été étudiés.

L'objectif principal de ce mémoire était donc de tester les effets potentiels du miel médical Revamil® sur la biologie des mitochondries et des lysosomes dans deux lignées cellulaires de macrophages : les RAW264.7 et les THP-1. Dans un deuxième temps, les effets modulateurs éventuels du Revamil® sur la réponse inflammatoire de macrophages stimulés par le LPS ont également été étudiés. Après avoir optimisé les conditions expérimentales et caractérisé les modèles cellulaires utilisés, nous avons étudié les effets potentiels du miel Revamil® sur l'abondance et la morphologie des mitochondries et des lysosomes, ainsi que sur les voies de signalisation contrôlant la biogenèse et les fonctions de ces organites.

Dans ce travail, nous avons notamment montré un effet du miel Revamil® sur l'activation transitoire de la voie de signalisation mTOR, connue pour réguler la biogenèse lysosomale, de nombreuses fonctions métaboliques et l'autophagie. De plus, nous avons mis en évidence que le Revamil® est capable d'induire une inhibition du flux autophagique qui se traduit par une augmentation de l'abondance de compartiments acides et des marqueurs autophagiques LC3-II et p62. Dans ce mémoire, nous avons donc mis en évidence un effet potentiel du miel Revamil® sur les réponses autophagiques des macrophages. Des études futures devront permettre de préciser les mécanismes et les composants du miel qui sont responsables des effets observés.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2018

Promoteur: T. Arnould

REMERCIEMENTS

Suite à ces 10 durs mois d'apprentissage et d'initiation au monde merveilleux de la recherche, il est temps de mettre de côté ma timidité, et de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Je souhaite tout d'abord remercier tous les professeurs de l'URBC pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Je tiens plus spécialement à remercier très chaleureusement mon promoteur Thierry Arnould pour ces nombreux conseils, son soutien et sa disponibilité tout au long du mémoire, et surtout pour la passion de la recherche qu'il m'a transmise. Je tiens aussi à remercier mon co-promoteur Michel Jadot, pour m'avoir également accueilli dans son labo en URPhyM et pour ses nombreux conseils avisés. Un grand merci à tous les deux.

J'aimerai également remercier tous les membres de l'équipe DYSO pour leur écoute et leur soutien en réunion et au labo. Merci à Patsy Renard, à Morgane, à Marino, et à Julie et tous les autres.

Je souhaite également adresser un énorme merci aux techniciens qui m'ont encadré pour toutes mes manips tout le long du mémoire. Merci à Antoine pour avoir passé du temps avec moi en RT-qPCR et pour tes petites citations, merci à Maude pour m'avoir aidé à rendre les western-blots plus agréables, merci à Martine pour ta gentillesse et tous tes conseils en culture cellulaire et au FACS, et surtout merci à Noëlle pour toutes ces heures que tu as passées accrochée au confocal avec moi. Mention spéciale pour Guy : merci pour ton sourire et ta bonne humeur quotidienne.

Je tiens aussi à remercier certains extérieurs à l'URBC. Je remercie notamment des membres de l'URPhyM comme Virginie Tevel pour l'aide qu'elle m'a apporté pour les dosages enzymatiques, et Isabelle Hamer pour ses conseils donnés pour la cytométrie de flux. Je remercie aussi Benoît Muylkens pour son accueil et pour m'avoir permis d'utiliser l'osmomètre en URVI.

Que serait un mémoire sans des collègues mémorants ? Un tout grand merci à Pauline, Marie-Albane, Mathilde, Amélie, An, Jia-Wei, Clotilde et Alison pour tes ces moments de sérieux et de rigolade passés au bureau ainsi que pour le soutien lors des moments de stress. I would also like to thank you, Margarida, for the beautiful partnership we made at the beginning of the master thesis.

Je souhaite enfin remercier ma maman et mes grands-parents pour le soutien apporté durant les longues journées de travail, et merci aussi à Lucille pour ta joie, ton rire, et toutes ces soirées passées à se soutenir mutuellement pour nos mémoires respectifs.

-

« La valeur d'un homme tient dans sa capacité à donner et non dans sa capacité à recevoir. »

Albert Einstein

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION 5

1.1. MACROPHAGES ET INFLAMMATION 5

1.1.1. Caractéristiques générales de l'inflammation 5

1.1.1.1. Fonctions de l'inflammation, première ligne de défense du système immunitaire 5

1.1.1.2. Acteurs et phases de la réponse inflammatoire 5

1.1.1.2.1. Phase plasmatique : activation du complément et hémostase 6

1.1.1.2.2. Phase pro-inflammatoire : l'initiation 6

1.1.1.2.3. Phase proliférative : l'amplification 6

1.1.1.2.4. Phase anti-inflammatoire et réparatrice : la résolution 7

1.1.2. Les macrophages : des sentinelles de l'inflammation 7

1.1.2.1. Origine et diversité des macrophages 7

1.1.2.2. Fonctions générales des macrophages 7

1.1.2.2.1. Phagocytose 7

1.1.2.2.2. Sécrétion de médiateurs inflammatoires 8

1.1.2.3. Polarisation des macrophages 8

1.1.2.3.1. Les macrophages M1 8

1.1.2.3.2. Les macrophages M2 8

1.1.3. Rôle des lysosomes et mitochondries dans les fonctions inflammatoires des macrophages 9

1.1.3.1. Le lysosome 9

1.1.3.1.1. Structure des lysosomes : un compartiment acide 9

1.1.3.1.2. Fonctions générales des lysosomes 10

1.1.3.1.2.1. Aperçu des fonctions lysosomales 10

1.1.3.1.2.2. Autophagie : un suicide cellulaire médié par les lysosomes ? 10

1.1.3.1.3. Biogenèse et régulation des fonctions lysosomales : la voie mTOR 12

1.1.3.2. La mitochondrie 13

1.1.3.2.1. Structure des mitochondries : l'unité isolée 13

1.1.3.2.2. Structure des mitochondries : un réseau dynamique 14

1.1.3.2.3. Fonctions générales des mitochondries : la production d'énergie et de ROS 15

1.1.3.2.4. Homéostasie mitochondriale : équilibre entre biogenèse et mitophagie 16

1.1.3.2.4.1. Mécanismes moléculaires régulant la biogenèse mitochondriale 16

1.1.3.2.4.2. Mécanismes moléculaires de la mitophagie 16

1.1.3.3. Altération des fonctions lysosomales et mitochondriales dans un contexte inflammatoire : la stimulation des macrophages au LPS 17

1.2. LE MIEL : DE LA RUCHE AU MONDE MÉDICAL 18
1.2.1. Processus de fabrication du miel par les abeilles 18
1.2.2. Composition générale du miel 18
1.2.2.1. Hydrates de carbone et dérivés organiques 19
1.2.2.2. Acides aminés et protéines 19
1.2.2.3. Flavonoïdes et Vitamines 19
1.2.3. Propriétés biologiques et curatives du miel 20
1.2.3.1. Propriétés antibactériennes 20
1.2.3.1.1. Acidité 20
1.2.3.1.2. Stress osmotique 20
1.2.3.1.3. Stress oxydatifs : la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 20
1.2.3.1.4. Glycation des protéines 20
1.2.3.1.5. Défensines des abeilles 21
1.2.3.2. Propriétés immunomodulatrices 21
1.3. OBJECTIFS ET CONTEXTUALISATION DU MÉMOIRE 22

2. MATERIELS ET METHODES 23

2.1. MIEL REVAMIL® 23
2.1.1. Origine et production du Revamil® 23
2.1.2. Utilisation du Revamil® pour les analyses expérimentales 23
2.2. CULTURE CELLULAIRE 23
2.2.1. Lignée cellulaire RAW264.7 23
2.2.1.1. Culture et repiquage des macrophages RAW264.7 23
2.2.1.2. Méthode de polarisation des macrophages RAW264.7 en macrophages M1 et M2 23
2.2.2. Lignée cellulaire THP-1 24
2.2.2.1. Culture et repiquage des monocytes THP-1 24
2.2.2.2. Méthode de différenciation et de polarisation des monocytes THP-1 24
2.3. MESURE DES EFFETS DU REVAMIL® SUR LE PH ET L'OSMOLARITÉ DES MILIEUX DE CULTURE 24
2.3.1. Mesure du pH 24
2.3.2. Mesure de l'osmolarité 24
2.4. TEST DE CYTOTOXICITÉ – TEST LDH 25
2.4.1. Principe du kit de détection de cytotoxicité (LDH) 25
2.4.2. Méthode 25
2.5. TESTS DE PROLIFÉRATION CELLULAIRE 26
2.5.1. Détermination de la concentration en protéines – Méthode de Folin 26
2.5.1.1. Principe 26
2.5.1.2. Méthode 26

2.5.2. Comptage cellulaire ... *26*
2.6. ANALYSE D'EXPRESSION DE GÈNES AU NIVEAU DU TRANSCRIT – RT-QPCR ... 27
2.6.1. Extraction et purification d'ARN total ... *27*
2.6.2. Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) ... *27*
2.6.2.1. Principe ... 27
2.6.2.2. Étape de rétro-transcription ... 27
2.6.2.3. Méthode de PCR quantitative en temps-réel (qPCR) ... 28
2.7. ANALYSE D'EXPRESSION DE GÈNES AU NIVEAU PROTÉIQUE – WESTERN-BLOT ... 28
2.7.1. Préparation de lysats cellulaires ... *28*
2.7.2. Dosage protéique – Méthode de Pierce 660 ... *28*
2.7.3. Western-blot en fluorescence ... *29*
2.7.3.1. Principe ... 29
2.7.3.2. Migration des protéines par électrophorèse ... 29
2.7.3.2.1. Méthode pour les gels SDS-PAGE « fait-maison » ... 29
2.7.3.2.2. Méthode pour les gels « NuPAGE™ » ... 29
2.7.3.3. Transfert des protéines sur membrane ... 29
2.7.3.3.1. Méthode de transfert semi-sec des protéines ... 29
2.7.3.3.2. Méthode de transfert rapide avec le Trans-Blot® Turbo™ ... 30
2.7.3.4. Marquage en immunofluorescence des protéines ... 30
2.7.3.4.1. Méthode ... 30
2.7.3.4.2. Quantification ... 30
2.8. MARQUAGE DES MITOCHONDRIES ET DES LYSOSOMES SUR CELLULES VIVANTES ... 30
2.8.1. Méthode de marquage des organites à l'aide de sondes fluorescentes ... *30*
2.8.2. Analyse de la morphologie du réseau mitochondrial ... *31*
2.8.3. Analyse de l'abondance lysosomale ... *31*
2.9. CYTOMÉTRIE DE FLUX ... 31
2.9.1. Principe ... *31*
2.9.2. Analyse de l'abondance des organites ... *32*
2.10. ANALYSES STATISTIQUES ... 32

3. RESULTATS ... 33

3.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET CARACTÉRISATION DES MODÈLES CELLULAIRES UTILISÉS ... 33
3.1.1. Effets du Revamil® sur le pH du milieu de culture RPMI sans sérum ... *33*
3.1.2. Effets du Revamil® sur l'osmolarité du milieu de culture DHG-L1 ... *33*
3.1.2.1. Effets du Revamil® sur l'osmolarité du milieu de culture DHG-L1 ... 33
3.1.2.2. Effets du Revamil® sur l'activation de la MAPK p38 ... 33

3.1.3. Effets du Revamil® sur la viabilité des cellules RAW264.7 et THP-1 ... *34*
3.1.4. Effets du Revamil® sur la prolifération des cellules RAW264.7 et THP-1 ... *35*
3.1.5. Effets du Revamil® sur la polarisation de macrophages ... *36*
3.1.5.1. Effets du Revamil® sur l'expression de gènes marqueurs de la polarisation M1 et M2 des macrophages RAW264.7 ... 36
3.1.5.2. Effets du Revamil® sur la morphologie mitochondriale et l'abondance lysosomale de macrophages THP-1 au cours de leur polarisation en macrophages M1 et M2 ... 36
3.2. ANALYSE DES EFFETS POTENTIELS DU REVAMIL® SUR LA BIOLOGIE DES MITOCHONDRIES ET DES LYSOSOMES DE MACROPHAGES STIMULÉS OU NON AU LPS ... 37
3.2.1. Effets du Revamil® sur la morphologie mitochondriale des macrophages THP-1 ... *37*
3.2.2. Effets du Revamil® sur l'abondance mitochondriale des macrophages RAW264.7 ... *38*
3.2.2.1. Analyse de l'abondance mitochondriale par cytométrie de flux ... 38
3.2.2.2. Analyse de l'abondance mitochondriale en microscopie confocale ... 39
3.2.2.3. Analyse de l'abondance des protéines mitochondriales TOM20 et VDAC ... 40
3.2.3. Effets du Revamil® sur l'abondance lysosomale des macrophages THP-1 et RAW264.7 ... *40*
3.2.3.1. Analyse de l'abondance lysosomale dans des macrophages THP-1 par microscopie confocale ... 40
3.2.3.2. Analyse de l'abondance lysosomale dans des macrophages RAW264.7 par cytométrie de flux ... 41
3.2.3.3. Analyse de l'abondance de la protéine lysosomale LAMP-1 dans des macrophages RAW264.7 ... 41
3.2.4. Effets du Revamil® sur l'activité d'enzymes mitochondriale et lysosomales ... *42*
3.3. ANALYSE DES EFFETS POTENTIELS DU REVAMIL® SUR LES MAJEURES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA BIOLOGIE DES MITOCHONDRIES ET DES LYSOSOMES ... 42
3.3.1. Effets du Revamil® sur l'abondance de PGC-1α dans des macrophages RAW264.7 ... *42*
3.3.2. Effets du Revamil® sur la voie mTOR dans des macrophages RAW264.7 ... *43*
3.3.3. Effets du Revamil® sur la réponse autophagique dans des macrophages RAW264.7 ... *43*

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES ... 44

4.1. OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET CARACTÉRISATION DES MODÈLES CELLULAIRES UTILISÉS ... 44
4.2. EFFETS DU REVAMIL® SUR LA BIOLOGIE DES MITOCHONDRIES ET DES LYSOSOMES DE MACROPHAGES STIMULÉS OU NON AU LPS ... 45

5. CONCLUSION GENERALE ... 50

6. BIBLIOGRAPHIE ... 51

Abréviation	*Signification*
4E-BP1	*eIF4E-binding protein 1*
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNmt	ADN mitochondrial
ADNn	ADN nucléaire
Akt (ou PKB)	*Protein kinase B*
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
ANT	*Adenine nucleotide translocator*
APS	Ammonium persulfate
AR	*Aspect ratio* (mitochondrial)
Arg 1	*Arginase 1*
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ASB	Albumine sérique bovine
ASR	Activité spécifique relative
ATCC	*American Type Culture Collection* (firme)
ATG	*Autophagy-related proteins*
ATP	Adénosine triphosphate
BAX	*BCL-2-associated X protein*
BMDM	*Bone-marrow derived macrophages*
CCL2	*Chemokin ligand 2*
CCS	Courbe de calibration standard
CO_2	Dioxyde de carbone
COX	Cyclooxygénase
CST	*Cell Signaling Technology* (firme)
Ct	*Cycle treshold*
CTE	Chaîne de transporteurs d'électrons
$CuSO_4$	Sulfate de cuivre (II)
CXCL8	*C-X-C motif chemokin ligand 8*
DAMP	*Damage associated molecular pattern*
DHG-L1	*DMEM High Glucose (4,5 g/L) – Low $NaHCO_3$ (1,5 g/L)*
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DRP-1	*Dynamin-related protein 1*
DSHB	*Developmental Studies Hybridoma Bank* (firme)
DTT	Dithiothreitol
EBR	*End-point / Branch-point ratio*
EDTA	Éthlyène diamine tétraacétique

eiF4E	*Eukaryotic translation initiation factor 4E*
EIM	Espace intermembranaire mitochondrial
ERRs	*Estrogen-related receptors*
$FADH_2$	*Flavine adenine dinucleotide*
FIS1	*Fission 1*
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLUT-1	*Glucose transporter 1*
GM-CSF	*Granulocyte and macrophage colony-stimulating factor*
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HBSS	*Hanks' balanced salt solution*
HCl	Acide chlorhydrique
HIF-1α	*Hyoxia inducible factor 1 alpha*
HKG	*House-keeping gene*
$HO^{\cdot}$	Radical hydroxyl
IDH2	Isocitrate déshydrogénase 2
IFNγ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IκB	*Inhibitor of NF-κB*
IL	*Interleukin*
iNOS	*Inducible nitric oxide synthase*
kDa	kilodalton
KCl	Chlorure de potassium
LAMP-1/2	*Lysosomal-associated membrane protein 1*
LC3	*Light chain 3*
LDH	*Lactate dehydrogenase*
LIMP-1/2	*Lysosomal integral membrane protein 1/2*
LPS	*Lipopolysaccharide*
LYNUS	*Lysosomal nutrient sensing*
M0	Macrophage non-polarisé
M1	Macrophage pro-inflammatoire (activation classique)
M2	Macrophage anti-inflammatoire (activation alternative)
MAMs	*Mitochondrial-associated membranes*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MARCO	*Macrophage receptor with collagenous structure*
MFN 1/2	*Mitofusin 1/2*
MGF-E8	*Milk fat globule-EGF factor 8 protein*
MGO	Méthylglyoxal
MHC	*Major histocompatibility complex*
mLST8	*Mammalian lethal with SEC thirteen 8*
MME	Membrane mitochondriale externe

MMI	Membrane mitochondriale interne
MRC1	*Mannose receptor C-type 1*
mTOR	*Mechanistic target of rapamycin*
mTORC1/2	*mTOR complex 1/2*
NaCl	Chlorure de sodium (sel de table)
Na_2CO_3	Carbonate de sodium
$NaHCO_3$	Hydrogénocarbonate de sodium (Bicarbonate de soude)
NaF	Fluorure de sodium
Na_3VO_4	Orthovanadate de sodium
NAD^+/NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (formes oxydée/réduite)
NF-κB	*Nuclear factor kappa B*
NK cells	*Natural killer (cells)*
NLRP3	*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
$NO^·$	Oxyde nitrique
NRF-1/2	*Nuclear respiratory factor 1/2*
O_2	Dioxygène
$O_2^{·(-)}$	Radical anionique superoxyde
$OONO^-$	Peroxynitrite
OPA1	*Optic atrophy 1*
OXPHOS	*Oxidative phosphorylations*
p-...	Forme phosphorylée d'une protéine
p62-SQSTM1	*Sequestosome 1*
PAMP	*Pathogen associated molecular pattern*
PAS	*Pre-autophagosomal structure*
PBS	*Phosphate Buffer Saline* – Tampon phosphate salin
PCR	*Polymerase chain reaction*
PDH	*Pyruvate dehydrogenase*
PE	Phycoérythrine
PG	Prostaglandine
PGC-1α	*PPARγ coactivator 1 alpha*
PI3K-I	*Phosphatidylinositol 3 kinase – class I*
PI3K-III	*Phosphatidylinositol 3 kinase – class III*
PIB	*Phosphatase inhibitor buffer*
PIC	*Protease inhibitor cocktail*
PINK1	*PTEN-induced putative kinase 1*
PM	Poids moléculaire
PMA	*Phorbol 12-myristate 13-acetate*
PPARγ	*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PVDF	*Polyvinylidène difluoride*
Rab	*RAS-related protein in brain*
RAPTOR	*Regulatory-associated protein of mTOR*

RE	Reticulum endoplasmique
Rheb	*RAS homolog enriched in brain*
RNS	*Reactive nitrogen species* – Espèces réactives de l'azote
ROS	*Reactive oxygen species* – Espèces réactives de l'oxygène
RPL13	*Ribosomal protein L13*
rpm	Révolution par minute
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute (medium)*
RT-qPCR	*Reverse transcription - quantitative PCR* – Rétro-transcription - PCR quantitative
S6K	*Ribosomal protein S6 kinase*
SDH	Succinate déshydrogénase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	*SDS – Polyacrylamide gel electrophoresis*
SIC	Sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur
SNARE	*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*
SOD	*Superoxide dismutase*
STAT	*Signal transducers and activators of transcription*
TA	Température ambiante
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
TFEB	*Transcription factor EB*
TGF-β	*Transforming growth factor beta*
TIM	*Translocase of the inner mitochondrial membrane*
TLR	*Toll-like receptors*
TNFα	*Tumor necrosis factor alpha*
TOM	*Translocase of the outer mitochondrial membrane*
TSC1/2	*Tuberous sclerosis 1 and 2 heterodimer*
V-ATPase	*Vacuolar H^+-ATPase*
VDAC	*Voltage-dependent anion channel*
VPS 15 / 34	*Vacuolar protein sorting 15 / 34*
UCP	*Uncoupling protein*
ULK 1/2	*Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2*

INTRODUCTION

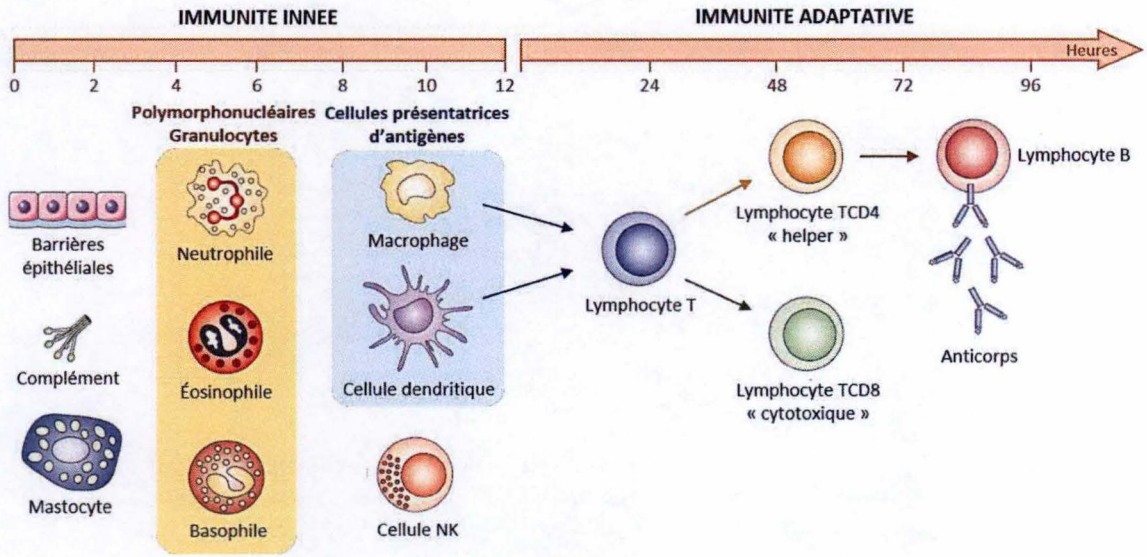


Figure 1.1. Acteurs des systèmes immunitaires inné et adaptatif.

Suite à un stimulus pro-inflammatoire (infection, blessure tissulaire ou dérèglement métabolique), les acteurs du système immunitaire inné sont recrutés et activés dans les premières heures suivant la lésion. Ces acteurs comprennent les épithélia (barrières physiques pour certaines lésions), les protéines de la voie du complément, les mastocytes, les polymorphonucléaires granulocytes (tels que les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles), les cellules NK cytotoxiques (« *natural killer* ») ainsi que les macrophages et les cellules dendritiques, des phagocytes professionnels tout comme les neutrophiles. Macrophages et cellules dendritiques ont également pour rôle de présenter d'éventuels antigènes étrangers aux lymphocytes T. Cette présentation d'antigènes active l'immunité adaptative (réponse plus longue dans le temps) et différencie les lymphocytes T en deux populations distinctes : les lymphocytes TCD8 cytotoxiques et les lymphocytes TCD4 impliqués dans l'activation des lymphocytes B responsables de la production d'anticorps contre les corps étrangers identifiés.
(Généré à partir de l'article de Dranoff (2004))

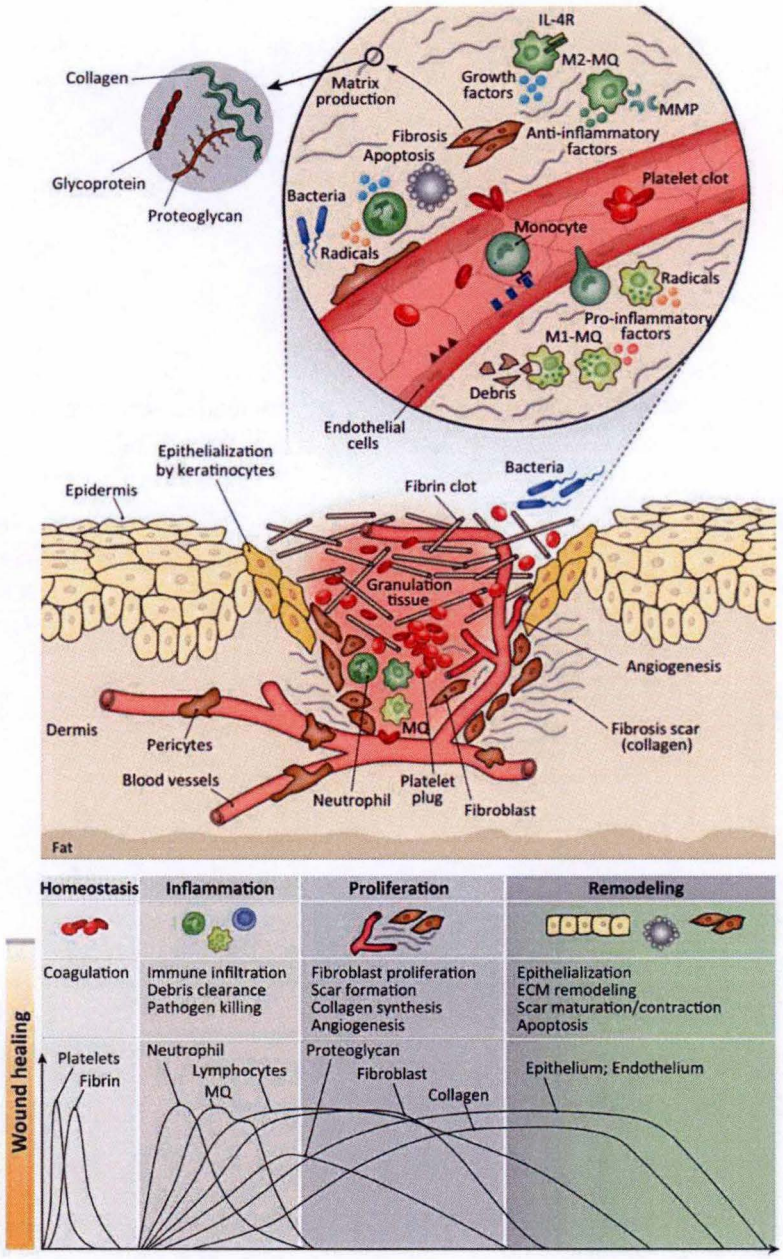


Figure 1.2. Acteurs et phases de la réponse inflammatoire – exemple d'une lésion cutanée.

La réponse inflammatoire est divisée en 4 phases : la phase plasmatique (homéostasie), la phase d'initiation (inflammation), la phase d'amplification (prolifération), et la phase de résolution (remodeling). Suite à une lésion cutanée profonde, un saignement résultant de l'altération de l'intégrité des vaisseaux sanguins induit la libération et l'activation des acteurs plasmatiques de la coagulation (plaquettes et fibrine) afin d'interrompre le saignement, d'empêcher la dispersion éventuelle de pathogènes et de fournir une structure d'appui pour la cicatrisation qui suivra. S'ensuit la phase inflammatoire décrite par le recrutement de cellules phagocytaires (macrophage set neutrophiles) responsables de l'élimination de pathogènes (par phagocytose et production d'espèces radicalaires (ROS)) et de l'élimination de débris cellulaires et corps apoptotiques. Les macrophages sécrètent également des médiateurs pro- et anti-inflammatoires afin d'assurer le bon déroulement de l'inflammation, ainsi que des phases de résolution de l'inflammation (arrêt contrôlé de l'inflammation). Les macrophages induisent ainsi la formation du tissu de granulation par le recrutement et la prolifération de fibroblastes responsables du remodelage de la matrice extra-cellulaire permettant la cicatrisation. La réparation tissulaire est décrite par l'élimination de fibroblastes et éventuelles cellules inflammatoires surnuméraires par apoptose, par la contraction de la lésion (cicatrisation), et par la ré-épithélialisation du tissu initialement lésé.
(Shechter and Schwartz, 2013)

1. INTRODUCTION

1.1. Macrophages et inflammation

1.1.1. Caractéristiques générales de l'inflammation

1.1.1.1. Fonctions de l'inflammation, première ligne de défense du système immunitaire

L'un des défis majeurs de tout mammifère pour survivre est de développer des mécanismes efficaces afin de se protéger de pathogènes, d'infections ou encore de blessures tissulaires sévères. La plupart de ces mécanismes de défense appartiennent au système immunitaire subdivisé en deux parties : l'immunité innée et l'immunité adaptative (Janeway and Medzhitov, 2002). Ces deux entités ne sont pas indépendantes et collaborent étroitement au bon fonctionnement du système immunitaire. En effet, l'immunité innée est une réponse défensive non-spécifique, courte dans le temps, qui permet la reconnaissance et l'élimination de pathogènes et de dommages tissulaires (Kumar *et al.*, 2011). L'immunité adaptative, quant à elle, se met en place suite à l'activation des réponses innées afin de développer une réponse défensive spécifique au type d'agression et maintenue dans le temps (Figure 1.1.) (Zinkernagel, 2003; Dranoff, 2004).

L'inflammation représente la composante majeure de l'immunité innée et correspond à la première ligne de défense d'un organisme face à l'invasion d'un pathogène ou en réponse à une lésion tissulaire (Medzhitov, 2008). La réponse inflammatoire est mise en place rapidement après la lésion et intègre plusieurs actions complexes qui se déroulent en différentes phases destinées à : 1) éliminer la cause initiale de l'agression tissulaire (exogène ou endogène); 2) activer le système immunitaire adaptatif afin d'initier une réponse plus précise et efficace contre l'agent causal via la production d'anticorps; 3) limiter une extension non-contrôlée des réponses pro-inflammatoires aux tissus sains (Tang *et al.*, 2017); et finalement, nettoyer la lésion en éliminant les débris cellulaires éventuels tout en initiant la cicatrisation et la réparation tissulaires (Aderem, 2003).

Toutefois, l'inflammation ne se limite pas aux infections ou aux lésions tissulaires cutanées (Medzhitov, 2008). Plusieurs études ont mis en évidence le dialogue entre les mécanismes à la base des réponses inflammatoires et les activités métaboliques chez les mammifères (Hotamisligil, 2006). Cette interface « inflammation – métabolisme » est ainsi considérée comme un mécanisme central de l'homéostasie. De nombreux facteurs (tels qu'un régime riche en graisses) peuvent altérer cette homéostasie, et conduire, par exemple, à un ensemble de maladies métaboliques chroniques liées à l'obésité (Cani *et al.*, 2008) telles que le diabète de type II (Esser *et al.*, 2014), des pathologies intestinales (Neurath, 2014), l'athérosclérose (Libby *et al.*, 2010), certains types de cancers (Coussens and Werb, 2002) et certaines maladies neurodégénératives (Glass *et al.*, 2010).

1.1.1.2. Acteurs et phases de la réponse inflammatoire

De nombreux types cellulaires tels que les polymorphonucléaires, les macrophages ou les fibroblastes sont sollicités durant les différentes phases de la réponse inflammatoire, et ce quel que soit la nature ou le site de la lésion initiale (Figure 1.2). Afin de produire une réponse efficace et contrôlée, les cellules inflammatoires doivent proliférer, s'activer et coopérer. Ces processus sont régulés par de nombreux médiateurs cellulaires que constituent les cytokines pro- ou anti-inflammatoires (interleukines, chémokines et interférons) sécrétées par des cellules initiatrices et reconnues par des cellules effectrices par leurs récepteurs spécifiques.

La réponse inflammatoire se déroule en quatre phases successives que sont : la phase plasmatique (activation de la voie du complément et hémostase), la phase pro-inflammatoire (initiation), la phase proliférative (amplification) et la phase anti-inflammatoire et réparatrice (résolution) (Figure 1.2.) (Velnar *et al.*, 2009; Shechter and Schwartz, 2013).

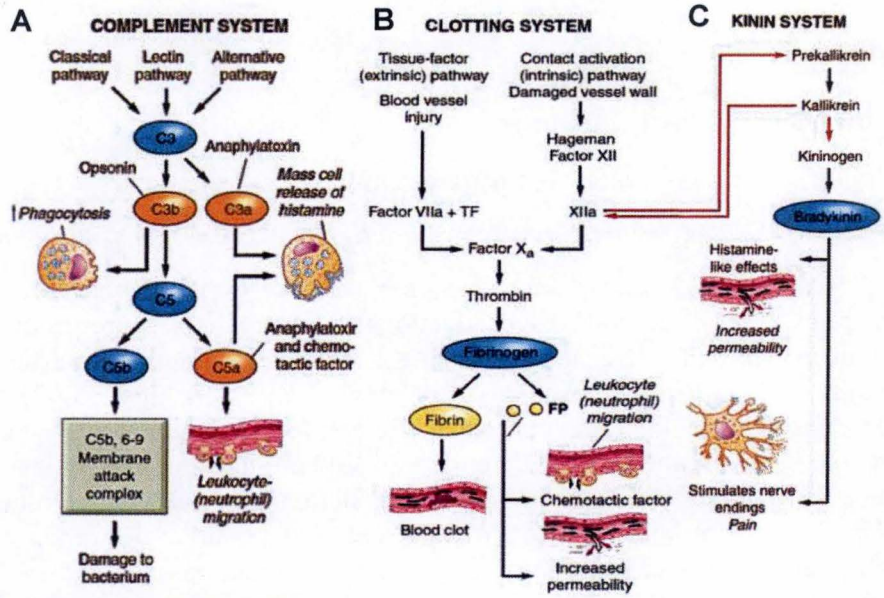


Figure 1.3. Acteurs plasmatiques de la réponse inflammatoire.

A. Les trois voies d'activation du complément mènent au clivage de la protéine C3 en fragments C3a, responsable de l'activation des mastocytes, et C3b. Le fragment C3b facilite les mécanismes de phagocytose par opsonisation des pathogènes et contribue au clivage de la protéine C5 en fragments C5a et C5b. Le fragment C5a agit comme un agent chémo-attractant pour recruter neutrophiles et monocytes sur le site inflammatoire, tandis que le fragment C5b marque les pathogènes opsonisés et initie la formation du pore d'attaque membranaire perforant littéralement les pathogènes. **B**. Des dommages vasculaires induisent l'activation de la cascade du système de la coagulation menant à la formation d'un réseau de fibrine formant un caillot sanguin bloquant saignement et dissémination de pathogènes éventuels. **C**. Le système des kinines est activé par le facteur XIIa de la coagulation et induit la production de bradykinine, un médiateur responsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la perception de douleur.
(*Understanding Pathophysiology, 5th Edition*, 2012)

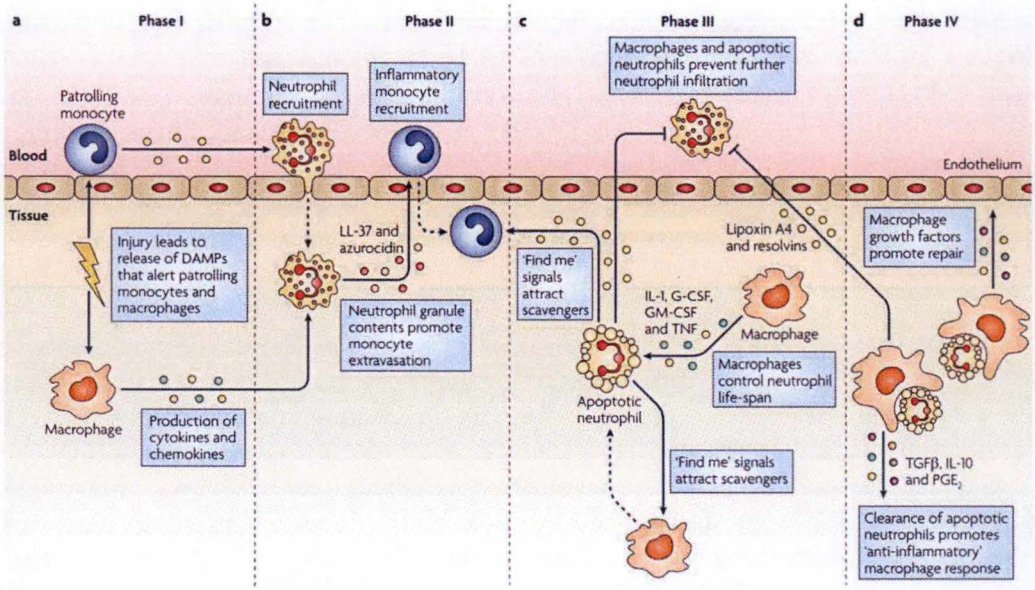


Figure 1.4. Interactions « neutrophiles – macrophages » dans les phases de l'inflammation.

Suite à la reconnaissance de PAMPs (« *pathogen associated molecular patterns* ») ou de DAMPs (« *damage associated molecular patterns* »), les macrophages résidents et monocytes circulants produisent des chémokines afin de recruter des neutrophiles sur le site inflammatoire pour leurs fonctions bactéricides et pro-inflammatoires. Les macrophages induisent ensuite rapidement l'apoptose des neutrophiles afin d'éviter une expansion non-contrôlée de l'inflamamtion, et les éliminent par phagocytose, permettant ensuite la mise en place de réponses anti-inflammatoires et de réparation tissulaire. (Soehnlein and Lindbom, 2010)

1.1.1.2.1. Phase plasmatique : activation du complément et hémostase

Lorsque l'intégrité vasculaire est compromise, un saignement est observé au sein de la lésion. Dans les minutes suivant la lésion, des acteurs plasmatiques se mettent en place s'inscrivant dans trois systèmes différents de protéines s'activant en cascades et agissant en synergie : les systèmes du complément, de la coagulation et des kinines (Figure 1.3.) (Ekdahl *et al.*, 2016; Ghebrehiwet *et al.*, 2016). La voie d'activation du complément facilite : 1) la destruction de certains pathogènes (opsonisés par des anticorps) via la formation du pore d'attaque membranaire, ainsi que 2) l'activation et la stimulation de la prolifération des acteurs cellulaires de l'inflammation et de l'immunité adaptative (Frank and Fries, 1991). Le système de la coagulation mène à l'élaboration d'un réseau de fibrine emprisonnant les plaquettes, les érythrocytes et pathogènes éventuels, permettant la formation d'un caillot sanguin susceptible d'interrompre le saignement, d'empêcher la dispersion éventuelle de pathogènes et de fournir une structure d'appui pour la cicatrisation (Long *et al.*, 2016). Le système de la coagulation interagit étroitement avec le système des kinines qui produit la bradykinine, un médiateur responsable de la dilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, ainsi que de la perception de la douleur suite à une stimulation de terminaisons nerveuses (Brown and Passmore, 2010).

1.1.1.2.2. Phase pro-inflammatoire : l'initiation

Lors d'un événement de coagulation, l'accumulation de thrombine (facteur II de la coagulation, une enzyme classée parmi les « trypsin-like » protéase à sérine) stimule les cellules endothéliales à produire des chémokines pro-inflammatoires comme le CCL2 (« *Chemokin ligand 2* »), l'IL-6 (« *interleukin 6* ») et l'IL-8 (« *interleukin 8* ») (Delavary *et al.*, 2011). En plus des fragments C5a de la voie du complément, ces chémokines forment un gradient chémo-attractant pour les neutrophiles et les monocytes circulants recrutés en quelques heures dans la zone inflammatoire. Ce recrutement qui conduit à la diapédèse est facilité par la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins environnants suite à l'action de l'histamine libérée par les mastocytes résidents (Delavary *et al.*, 2011). Les macrophages résidents sont également nécessaires au recrutement des neutrophiles par la sécrétion d'IL-8 (Duque and Descoteaux, 2014). Une fois activés, les neutrophiles libèrent des enzymes bactéricides (telles que le lysozyme ou la myélopéroxydase) par un mécanisme de « dégranulation » et phagocytent certains pathogènes (Amulic *et al.*, 2012). Les neutrophiles entrent ensuite rapidement en apoptose afin d'éviter une expansion de l'inflammation (Figure 1.4.). La phagocytose de pathogènes et de corps apoptotiques neutrophiliques est ensuite prise en charge par les macrophages, qui produisent aussi des espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), toxiques pour les pathogènes. Les macrophages sont également des cellules indispensables au bon déroulement de la réparation tissulaire durant les phases d'amplification et de résolution de l'inflammation (Velnar *et al.*, 2009).

1.1.1.2.3. Phase proliférative : l'amplification

Sous l'action de chémokines et de nombreux facteurs de croissance sécrétés par les macrophages comme le TGF-β (« *transforming growth factor β* »), des fibroblastes migrent dans la zone inflammatoire et y prolifèrent, ce qui génère un tissu de granulation (Velnar *et al.*, 2009; Shechter and Schwartz, 2013). Au sein de ce tissu, les fibroblastes remodèlent la matrice extracellulaire par une synthèse de collagène de type I servant de support à la réparation tissulaire. De plus, les fibroblastes du tissu de granulation produisent du VEGF (« *vascular endothelial growth factor* ») induisant une prolifération de cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) palliant à la demande croissante en nutriments et oxygène au sein de la zone proliférative (Delavary *et al.*, 2011).

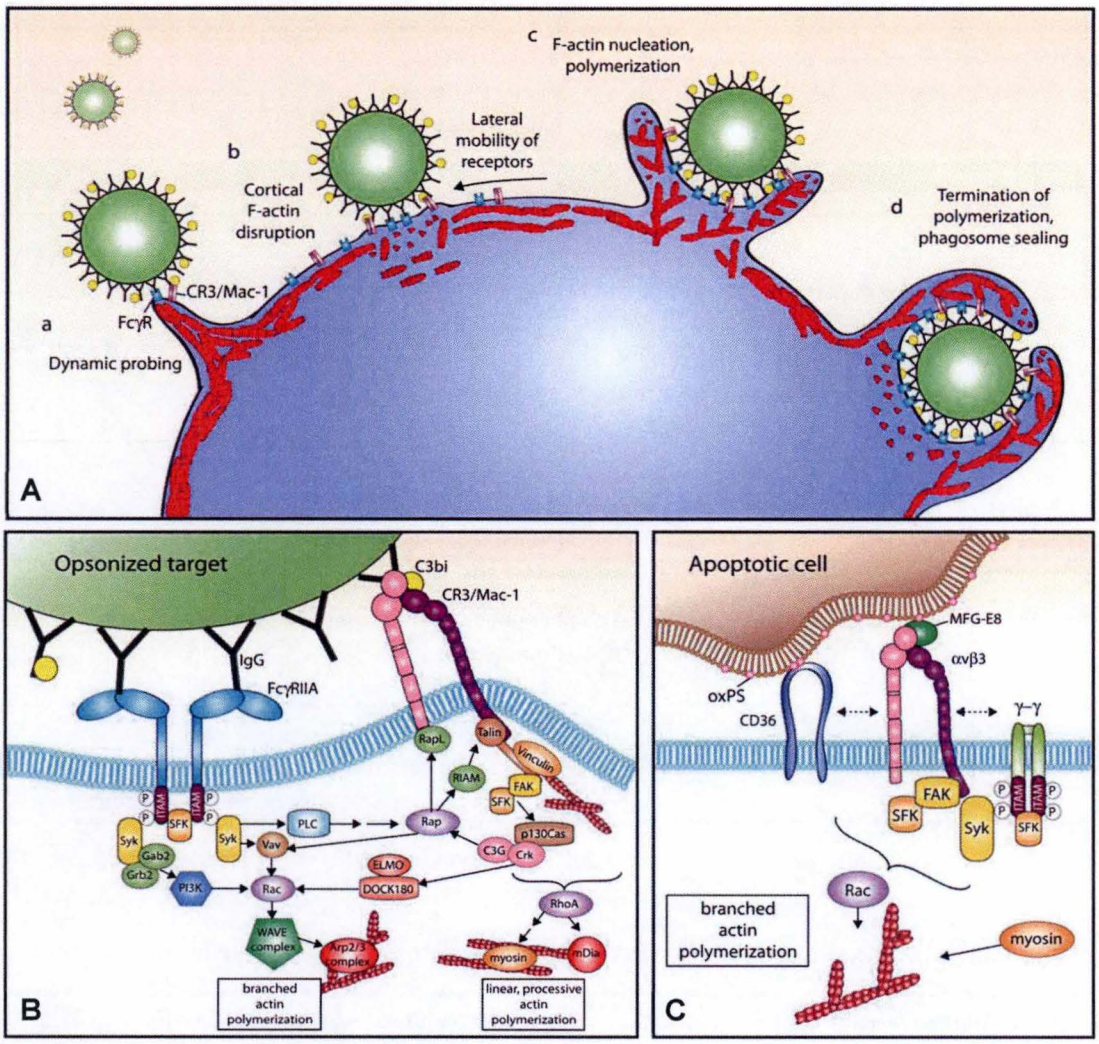


Figure 1.5. Mécanismes moléculaires de la phagocytose.

A. La phagocytose de corps exogènes (pathogènes ou corps apoptotiques) est médiée par des récepteurs spécifiques présents en membrane du phagocyte professionnel (tels que les récepteurs Fc, CR3 ou TLR – voir Tableau 1.1.). La liaison de la particule au phagocyte induit un rassemblement de ces récepteurs afin d'y induire localement une modulation du réseau de filaments intermédiaires d'actine. Le remodelage et la polymérisation induite de l'actine permet la formation de protrusions membranaires autour de la particule qui sera finalement internalisée au sein d'une vésicule appelée phagosome, destinée à fusionner avec le lysosome afin d'en dégrader le contenu. **B.** La phagocytose de pathogènes opsonisés (par des anticorps IgG et des fragments C3b du complément) est médiée par les récepteurs FcγRII (des récepteurs à tyrosine kinase se liant aux IgG) et le récepteur CR3 (une intégrine se liant aux fragments C3b). L'activation de FcγRII active la voie de signalisation PI3K menant l'activation des GTPases Rap, Rac et Rho. Les GTPases Rap sont impliquées dans l'activation « *inside-out* » des intégrines menant à l'initiation de la protrusion dynamique membranaire. Les GTPases Rac et Rho sont respectivement impliquées dans la polymérisation branchée ou linéaire de l'actine. **C.** La phagocytose des corps apoptotiques est médié par les récepteur scavengers CD36 qui se lient aux phosphatidylsérines oxydées présents à leur surface. Cette activation induit également l'activation d'intégrines αVβ3 et des GTPases Rac, tous deux impliqués dans la la polymérisation de l'actine et la protrusion membranaire.
(Freeman and Grinstein, 2014)

Tableau 1.1. Exemples des récepteurs de macrophages et de leurs ligands impliqués dans les mécanismes de phagocytose.

Récepteurs	*Ligands*
Récepteurs scavengers de PAMPs	
- **TLR2/TLR6**	Zymosan (levures)
- **TLR3**	ARN double-brin (virus)
- **TLR4**	LPS (bactéries)
- **TLR5**	Flagelline (bactéries)
- **TLR9**	Îlots CpG non-méthylés (bactéries)
- **Dectine-1**	β-glucan (bactéries)
- **Lectines de type C (MRC1)**	Mannose (bactéries)
- **MARCO**	Ligand bactérien aspécifique
Récepteurs opsoniques de type Fc	
- **FcγRI**	Domaine Fc des IgG1
- **FcγRII**	Domaine Fc des IgG1 et IgG2
- **FcγRIII**	Domaine Fc des IgG3
- **FcαRI**	Domaine Fc des IgA
- **FcεRI**	Domaine Fc des IgE
Intégrines	
- **CR3**	Fragment C3b du complément
- **α5β1**	Fibronectine
- **αVβ3**	MGF-E8
Récepteurs scavengers de DAMPs	
- **MGF-E8**	Phosphatydilsérine (corps apoptotiques)
- **CD36**	Phosphatydilsérine oxydée (corps apoptotiques)

(Réalisé à partir des articles de : Aderem (2003); Underhill and Goodridge (2012) et Freeman and Grinstein, (2014))

Tableau 1.2. Fonctions des majeures cytokines et prostaglandines sécrétées par les macrophages.

Médiateurs inflammatoires	*Fonctions majeures*
Cytokines et Chémokines	
- **IL-1β**	Pyrogénique, amplification de l'inflammation, prolifération des cellules NK
- **IL-6**	Pyrogénique, différenciation de lymphocytes B et production d'IgG
- **IL-8 (ou CXCL8)**	Chémo-attractant de neutrophiles et induction de leur dégranulation
- **IL-12**	Activation des cellules NK et lymphocytes T, anti-angiogénique
- **IL-18**	Activation des cellules NK et lymphocytes T, induction de la production d'IFNγ
- **IL-23**	Activation des lymphocytes T, induction de la production d'IFNγ
- **TNFα**	Pyrogénique, activation des phagocytes, production de cortisol
- **GM-CSF**	Production de monocytes et de granulocytes
- **IL-10**	Inactivation des macrophages et de la production de cytokines pro-inflammatoires
- **TGF-β**	Inactivation des macrophages, prolifération des fibroblastes, réparation tissulaire
Prostaglandines	
- **PGE_2**	Activation des cellules dendritiques et lymphocytes T, inactivation des cellules NK
- **PGI_2**	Vasodilatateur, augmente la perméabilité vasculaire
- **PGD_2**	Activation des mastocytes, inhibition de l'expression de l'iNOS,
- **PGJ_2**	Inhibition du facteur de transcription pro-inflammatoire NF-κB

(Réalisé à partir des articles de : Ricciotti and FitzGerald (2011); Turner *et al.* (2014) et Duque and Descoteaux (2014))

1.1.1.2.4. Phase anti-inflammatoire et réparatrice : la résolution

Bien que nécessaire, l'inflammation doit être contrôlée et résolue, ce qui évitera l'installation d'une inflammation chronique. C'est la raison pour laquelle de nombreux médiateurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 (« *interleukin 10* ») ou les résolvines, sont produits rapidement, et ce, déjà après la phase d'initiation (Eming *et al*, 2007). Les résolvines sont des médiateurs lipidiques dérivés d'acides gras insaturés (ω3) et impliqués dans l'inhibition de l'activité des neutrophiles et des macrophages (Serhan and Petasis, 2011). Progressivement, le tissu de granulation se résorbe, les fibroblastes se différencient en myofibroblastes impliqués dans la contraction de la lésion, la cicatrisation et la régénération tissulaire. Enfin, les macrophages et fibroblastes surnuméraires sont éliminés par apoptose et la lésion est réparée (Shechter and Schwartz, 2013).

1.1.2. Les macrophages : des sentinelles de l'inflammation

1.1.2.1. Origine et diversité des macrophages

Les macrophages résultent de la diapédèse et de la différentiation de monocytes circulants au niveau du site inflammatoire. Ces cellules proviennent de la lignée myéloïde constituée au sein de la moelle osseuse (Geissmann *et al.*, 2003). Elles ne sont pas uniquement recrutées suite à un stimulus pro-inflammatoire, mais ont également colonisé la majorité des tissus dans un état « quiescent et non-activé » (Murray and Wynn, 2011). Ces macrophages sont appelés « résidents » et exercent un rôle de surveillance immunitaire, prêt à s'activer et à initier l'inflammation dès la perception d'un corps étranger ou de dommages tissulaires (Davies *et al.*, 2013). En fonction du tissu colonisé, une grande diversité de sous-populations de macrophages spécialisés est observée, tels que les microgliocytes, les cellules de Kupffer, les macrophages alvéolaires ou les ostéoclastes (Murray and Wynn, 2011).

1.1.2.2. Fonctions générales des macrophages

Comme déjà mentionné, les macrophages représentent la première ligne de défense de l'immunité innée lors d'une agression tissulaire, et sont essentielles à chaque étape de l'inflammation. En effet, les macrophages présentent deux fonctions majeures au sein du foyer inflammatoire : assurer la phagocytose d'éventuels pathogènes et de corps apoptotiques, et réguler la réponse inflammatoire par la sécrétion de nombreuses cytokines pro- ou anti-inflammatoires.

1.1.2.2.1. Phagocytose

Les macrophages, tout comme les neutrophiles, sont qualifiés de phagocytes « professionnels » (Rabinovitch, 1995; Gordon, 2016). Ils assurent l'élimination de pathogènes éventuels, de débris cellulaires et de corps apoptotiques neutrophiliques par la phagocytose (Aderem, 2003). La phagocytose est un mécanisme cellulaire d'internalisation menant à la formation d'un phagosome dont le contenu est destiné à être dégradé suite à sa fusion avec les lysosomes (Figure 1.5.) (Stern *et al.*, 2014). Contrairement aux phagocytes « non-professionnels (cellules épithéliales et fibroblastes) les phagocytes professionnels expriment de nombreux récepteurs spécifiques à leur surface (Tableau 1.1.) (Akira *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2005; Zhang and Mosser, 2008) leur permettant de reconnaître des PAMPs (« *pathogen associated molecular patterns* »), des pathogènes opsonisés par des anticorps, ainsi que des DAMPs (« *damage associated molecular patterns* ») et des corps apoptotiques. Cette reconnaissance est la première étape d'un processus menant à leur internalisation et à leur dégradation (Freeman and Grinstein, 2014). Cette dégradation se produit dans des compartiments acides riches en ROS, en peptides toxiques et en hydrolases : les phagolysosomes (Aderem, 2003; Gordon, 2016). Les peptides pathogéniques et étrangers éventuels résultant de cette dégradation sont ensuite associés au complexe majeur d'histocompatibilité (MHC-I pour les pathogènes intracellulaires ou MHC-II pour les pathogènes extracellulaires) et redirigés vers la membrane plasmique du macrophage où les antigènes sont présentés aux cellules de lymphocytes T (Unanue, 1984). Les macrophages font ainsi partie des cellules présentatrices d'antigènes, au même titre que les cellules dendritiques.

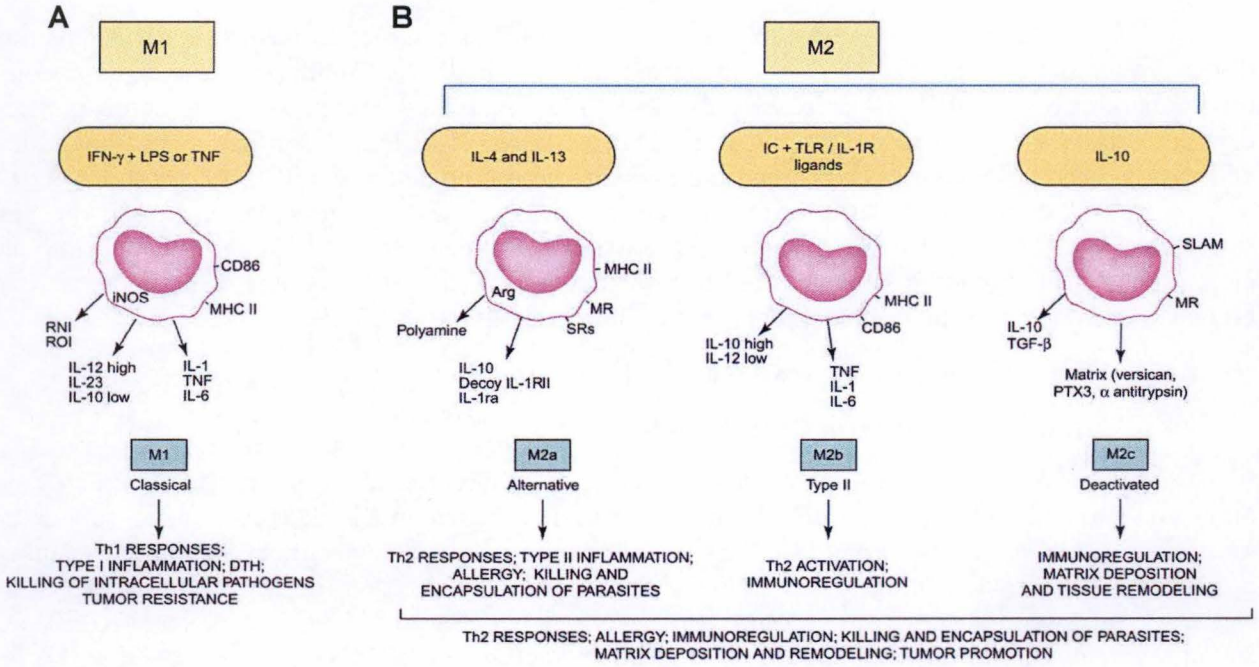


Figure 1.6. Inducteurs, caractéristiques et fonctions des phénotypes majeurs de macrophages polarisés.

A. Suite à une exposition à l'IFNγ, les macrophages sont préparés à répondre au TNFα ou à des inducteurs du TNFα tels que le LPS. Ces signaux induisent un phénotype de polarisation M1 des macrophages caractérisés par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-β, l'IL-6, le TNFα, l'IL-12 et l'IL-23. Les macrophages M1 sont aussi définis par une augmentation de l'expression de l'iNOS responsable de la production de $NO^{\cdot}$ et par la formation d'intermédiaires réactifs de l'azote (RNI) et de l'oxygène (ROI). Les macrophages M1 sont ainsi impliqués dans les réponses pro-inflammatoires et anti-tumorales, tandis que les macrophages M2 jouent plutôt un rôle immunorégulateur impliqué dans la résolution de l'inflammation et sont plutôt pro-tumoraux. **B.** Les macrophages M2 sont divisés en trois phénotypes différents sous-types. Le phénotype M2a est déclenché en présence d'IL-4 et d'IL-13. Les macrophages M2a produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et promeuvent l'expression de l'arginase 1 (responsable de l'inhibition de l'iNOS) et de récepteurs scavengers (SRs) de sucres bactériens tels que MRC1. Le phénotype M2b est déclenché en présence de complexes immuns et de LPS. Les macrophages M2b produisent à la fois des cytokines pro-inflammatoires (l'IL-β, l'IL-6, et TNFα) et anti-inflammatoires (IL-10) est présentent une fonction immunomodulatrice. Enfin, le phénotype M2c est déclenché en présence d'IL-10. Les macrophages M2c produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF-β impliqué dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire.
(Mantovani *et al.*, 2014)

1.1.2.2.2. Sécrétion de médiateurs inflammatoires

Les macrophages sont d'importants acteurs dans la régulation de la réponse inflammatoire via la sécrétion d'un ensemble de cytokines inflammatoires et de prostaglandines (PG), des médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique et synthétisés par la COX-2 (« *cyclooxygenase 2* ») (Tableau 1.2.). Les macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β (« *interleukin 1 β* »), l'IL-6 (« *interleukin 6* ») et le TNFα (« *tumor necrosis factor α* ») notamment impliquées dans le recrutement, l'activation et la prolifération de cellules inflammatoires (neutrophiles et monocytes) (Duque and Descoteaux, 2014). Les prostaglandines pro-inflammatoires telles que PGE_2 et PGI_2 sont responsables de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Ricciotti and FitzGerald, 2012). Les macrophages synthétisent également l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire), les PGD_2 et PGJ_2 (prostaglandines anti-inflammatoires), et les résolvines, importants pour la résolution de l'inflammation (Ricciotti and FitzGerald, 2012; Duque and Descoteaux, 2014).

1.1.2.3. Polarisation des macrophages

Vu leur implication dans des mécanismes aussi bien pro-inflammatoires qu'anti-inflammatoires, les macrophages présentent une plasticité fonctionnelle qui évolue tout au long des étapes de l'inflammation (Sica and Mantovani, 2012). Ainsi, en fonction du microenvironnement rencontré, les macrophages peuvent se polariser en deux phénotypes fonctionnels extrêmes : les macrophages M1 (plutôt pro-inflammatoires) ou M2 (plutôt anti-inflammatoires) (Mosser and Edwards, 2008; Murray, 2017). Il existe cependant de nombreux types intermédiaires de macrophages tels que les macrophages MOx ou Mhem (étudiés dans le cadre de l'athérosclérose) (Labonte *et al.*, 2014). Nous ne décrirons ci-dessous que les macrophages M1 et M2.

1.1.2.3.1. Les macrophages M1

La polarisation de macrophages M0 en macrophages M1 (activation classique) est déclenchée en début de réponse inflammatoire suite à une stimulation des récepteurs TLR (« *Toll-like receptors* ») via des ligands tels que le LPS (« *lipopolysaccharide* ») bactérien, ainsi qu'en présence d'IFNγ (« *interferon γ* ») sécrétés par les neutrophiles et macrophages résidents (Murray and Wynn, 2011; Sica and Mantovani, 2012; Juhas *et al.*, 2015) (Figure 1.6A.). Cette stimulation déclenche les voies les signalisation de NF-κB (« *nuclear factor κappa B* ») et de STAT1 (« *signal transducers and activators of transcription 1* ») qui induisent l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-6 et le TNFα, générant ainsi un phénotype pro-inflammatoire (Lopez-Castejón *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2014). De plus, l'expression de l'iNOS (« *inducible nitric oxide synthase* ») est également augmentée dans les macrophages M1 (Mantovani *et al.*, 2004). L'iNOS est une enzyme inductible produisant de l'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$) au cours de la réaction de conversion de la molécule de L-arginine en L-citrulline qu'elle catalyse. Le $NO^{\cdot}$ est un agent vasodilatateur et vasorelaxateur qui peut devenir cytotoxique à forte concentration. En effet, ce radical libre mène à la formation d'espèces réactives de l'azote (RNS) telles que le peroxynitrite ($ONOO^-$) en réagissant avec le radical anionique superoxyde ($O_2^{\cdot(-)}$) (Aktan, 2004).

1.1.2.3.2. Les macrophages M2

La polarisation de macrophages M0 en macrophages M2 (activation alternative) est déclenchée en cours de réponse inflammatoire et génère un phénotype globalement anti-inflammatoire (Murray, 2017) (Figure 1.6B.). Les macrophages M2 sont classifiés en trois sous-types : M2a, M2b, et M2c (Juhas *et al.*, 2015). La polarisation M2a est obtenue en présence d'IL-4 (« *interleukin 4* ») et d'IL-13 (« *interleukin 13* ») toutes deux sécrétées par les mastocytes, et génère un phénotype anti-inflammatoire permettant à la fois à l'encapsulation de pathogènes et la résolution de l'inflammation (Mantovani *et al.*, 2004). La stimulation à l'IL-4 et l'IL-13 active les voies de signalisation des STAT-3 et STAT-6, induisant une augmentation de l'expression des gènes codants pour l'IL-10, de l'Arg 1

(« *arginase 1* ») et MRC1 (« *mannose receptor C-type 1* ») (Lopez-Castejón *et al.*, 2011). L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire impliquée dans la régulation négative des fonctions pro-inflammatoires des macrophages en y instaurant une boucle rétroactive inhibitrice (Ip *et al.*, 2017). L'arginase 1 est une enzyme qui hydrolyse la molécule de L-arginine en ornithine et urée (Rath *et al.*, 2014). Cette réaction limite ainsi la disponibilité de la L-arginine pour l'iNOS (et donc la production de NO·), inhibant ainsi le phénotype pro-inflammatoire des macrophages M1. De plus, l'ornithine permet d'entamer la voie de synthèse des polyamines (impliquées dans la croissance cellulaire) et est un précurseur de la synthèse de la proline (elle-même précurseur de la synthèse de collagène de type I) favorisant la régénération tissulaire (Rath *et al.*, 2014). MRC1 est une lectine (récepteur liant des sucres) de type C qui reconnait les structures mannosylées présentes à la surface de certains pathogènes (tels que *Candida albicans* ou *Mycobacterium tuberculosis*) permettant leur internalisation et leur dégradation (Gazi and Martinez-Pomares, 2009). MRC1 joue également un rôle important dans la résolution de l'inflammation en liant les oligosaccharides riches en mannoses présents dans des glycoprotéines pro-inflammatoires circulantes telles que les hydrolases lysosomales ou les myéloperoxydases libérées suite à la dégranulation des neutrophiles (Lee *et al.*, 2002; Gazi and Martinez-Pomares, 2009).

La polarisation M2b nécessite la liaison de ligands spécifiques aux récepteurs TLR (comme le TLR4 pour LPS) ainsi qu'aux récepteurs à l'IL-1 (Mantovani *et al.*, 2004). Cette stimulation génère un phénotype immunorégulateur par l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des cytokines à la fois pro- (IL-1, IL-6, TNFα) et anti-inflammatoires (IL-10 et IL-12).

La polarisation M2c, quant à elle, est déclenchée en présence d'IL-10 et génère un phénotype anti-inflammatoire impliqué dans la résolution de l'inflammation via l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β, une cytokine impliquée dans la réparation tissulaire et la cicatrisation (Duque and Descoteaux, 2014).

1.1.3. Rôle des lysosomes et mitochondries dans les fonctions inflammatoires des macrophages

Comme exposé précédemment, la réponse inflammatoire est un mécanisme complexe, qui évolue dans le temps. Elle résulte de l'intégration de nombreux signaux et est régulée par de nombreux acteurs cellulaires, dont les macrophages. Il est récemment apparu que les organites tels que les lysosomes et les mitochondries, importants régulateurs de l'homéostasie cellulaire, sont également essentiels au métabolisme et aux fonctions des macrophages lors de réponses inflammatoires (Tschopp, 2011; Zhou *et al.*, 2011; Kabat and Pearce, 2017; Harris *et al.*, 2017; Mills *et al.*, 2017). Après avoir brièvement détaillé leurs structures et leurs principales fonctions, leurs rôles dans les fonctions inflammatoires des macrophages seront décrits.

1.1.3.1. Le lysosome

1.1.3.1.1. Structure des lysosomes : un compartiment acide

Le lysosome, dont l'étymologie grecque signifie « corpuscule digestif », fut décrit pour la première fois par le professeur Christian de Duve comme étant des « particules acides spécialisées dans la dégradation de macromolécules » (Appelmans *et al.*, 1955).

Les lysosomes sont des organites ubiquistes de forme généralement sphérique (bien que des formes tubulaires puissent être rencontrées, notamment dans des macrophages (Saric *et al.*, 2016)), d'un diamètre d'un 1 µm, quoiqu'ils puissent dépasser plusieurs micromètres dans les macrophages (Lüllmann-Rauch, 2005). Ces organites sont délimités par une bicouche de phospholipides où l'on trouve plus de 20 protéines membranaires, dont les plus abondantes sont LAMP-1 et LAMP-2 (« *lysosomal-associated membrane protein* »), ainsi que LIMP-1 et LIMP-2 (« *lysosomal integral membrane protein* ») (Eskelinen *et al.*, 2003 ; Appelqvist *et al.*, 2017). LAMP-1 et LAMP-2 sont des

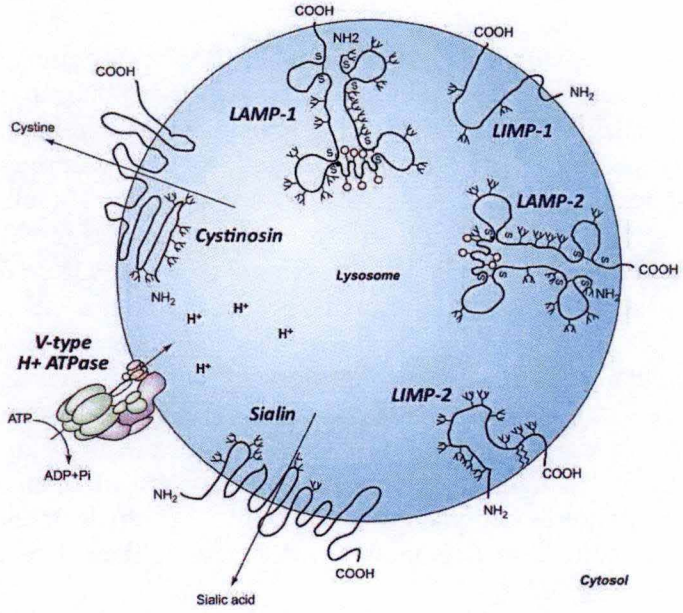


Figure 1.7. Structure schématique des principales protéines membranaires du lysosome.

Les membranes des lysosomes sont principalement constituées des protéines intégrales LAMP-1 et LAMP-2 de structure très proche et présentant un domaine luminal conséquent et hautement glycosylé, assurant l'intégrité de la protéine en la protégeant de l'activité hydrolytique des enzymes lysosomales intraluminales. Les ronds représentent une O-glycosylation, et les branches une N-glycosylation. D'autres protéines telles que LIMP-1 et LIMP-2 sont également présentes dans la membrane lysosomale. Les lysosomes présentent aussi en membrane des V-H^+-ATPases responsables de l'acidification de la lumière lysosomale. Enfin, les membranes lysosomales abritent de nombreux transporteurs tels que la cystinosine ou la sialine, qui redistribuent les métabolites (principalement acides aminés) générés suite à l'action des hydrolases sur le cargo intra-lysosomal, afin d'alimenter les réactions anaboliques de la cellule.
(adapté de l'article de Eskelinen *et al.*, 2003)

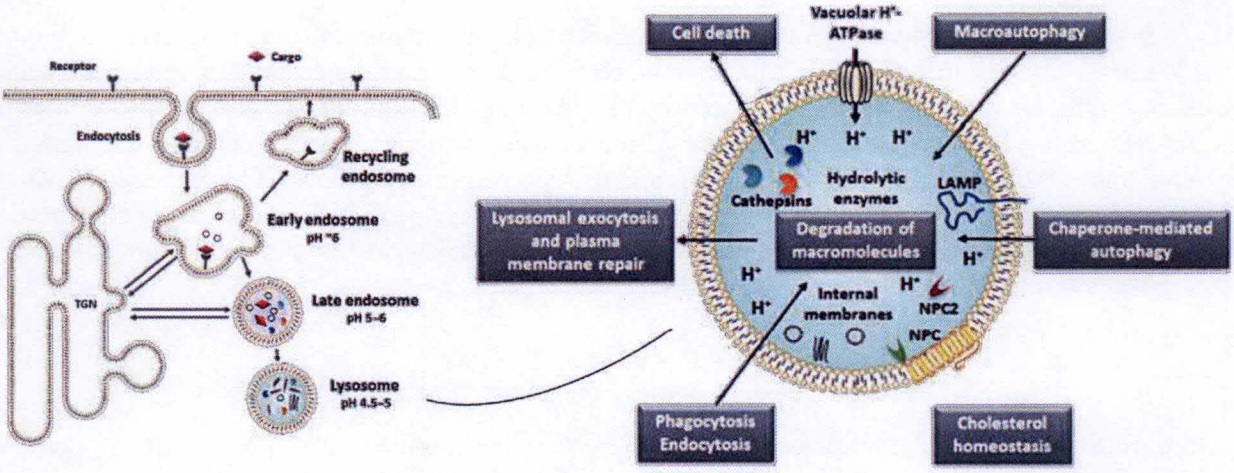


Figure 1.8. Fonctions du lysosome au sein du système endo-membranaire.

Le lysosome fait partie du système endo-membranaire, et a pour majeure fonction de dégrader les macromolécules (exogènes ou endogènes) amenées par des vésicules (endosomes, phagosomes ou autophagosomes) avec lesquels il fusionne. Les lysosomes sont ainsi impliqués dans l'endocytose, la phagocytose et l'autophagie (macro-autophagie ou autophagie d'agrégats protéiques médiée par des chaperonnes). La dégradation intraluminale des macromolécules est médiée par des hydrolases dont l'activité est optimisée grâce au pH faible (situé entre 4,5 et 5) conféré par les V-ATPases. D'autres fonctions lysosomales incluent la réparation de la membrane plasmique par exocytose membranaire, l'homéostasie du cholestérol médiée par les transporteurs NPC (« *Niemann-Pick C* ») et la contribution aux programmes de mort cellulaires suite à la perméabilisation membranaire et la libération de cathepsines (des protéases) dans le cytosol. (Appelqvist *et al.*, 2017)

glycoprotéines représentant environ 50% de l'abondance des protéines membranaires lysosomales. Elles sont essentielles à l'intégrité du lysosome, ainsi qu'aux mécanismes de fusion avec d'autres vésicules comme les endosomes ou les phagosomes (Eskelinen, 2006 ; Huynh *et al.*, 2007). La majorité des protéines membranaires telles que LAMP-1 et -2 sont hautement glycosylées au niveau de leur domaine intraluminal, formant un glycocalyx qui les protège de l'activité protéolytique des hydrolases lysosomales (Appelqvist *et al.*, 2017) (Figure 1.7.).

D'autres protéines membranaires telles que les V-ATPases (« *Vacuolar H^+-ATPases* ») sont essentielles à l'acidification et au maintien du pH acide intra-lysosomal qui varie entre 4,5 et 5,0 (Mindell, 2012). Les V-ATPases sont des pompes à protons qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP afin d'entraîner des protons H^+ du cytosol vers le lysosome. Ce mécanisme induit l'apparition d'une charge positive au sein du lysosome, qui est, entre-autres, dissipée par l'efflux d'ions potassium (K^+) grâce aux canaux cationiques également présents dans la membrane lysosomale (Mindell, 2012).

L'environnement acide conféré par les V-ATPases facilite les mécanismes de dégradation des macromolécules suite à la perte de leur conformation ainsi qu'une optimisation de l'activité des hydrolases lysosomales (Coffey and de Duve, 1968). Ces hydrolases luminales, dont plus d'une cinquantaine ont été identifiées (Lübke *et al.*, 2009), regroupent de grandes familles d'enzymes impliquées dans le catabolisme des macromolécules, telles que des protéases (les cathepsines), des glycosidases (la β-galactosidase, la β-hexosaminidase, etc ...), mais aussi des lipases, des nucléases, des phosphatases et des sulfatases (Appelqvist *et al.*, 2017). Il est toutefois intéressant de noter que les lysosomes sont dépourvus d'invertase, l'enzyme qui catabolise le saccharose en glucose et fructose (Jadot *et al.*, 1985). Cette propriété permet d'expliquer l'observation d'une accumulation intra-lysosomale de saccharose lorsqu'il est présent dans le milieu de culture de ces cellules, conduisant à une surcharge lysosomale (pour une revue récente sur les maladies de surcharge lysosomales, voir Ferreira and Gahl, 2017), et une augmentation de la taille de l'organite (Bandyopadhyay *et al.*, 2014).

1.1.3.1.2. Fonctions générales des lysosomes

1.1.3.1.2.1. Aperçu des fonctions lysosomales

Le lysosome est un organite du système endomembranaire qui fusionne avec des vésicules du trafic intracellulaire ce qui achève la dégradation de membranes et macromolécules exogènes ou endogènes qui y sont acheminées (Figure 1.8) (Appelqvist *et al.*, 2017). Les composés extracellulaires qui seront dégradés et recyclés par le lysosome proviennent d'endosomes ou de phagosomes (vésicules spécialisées dans l'internalisation de pathogènes). Les mécanismes endocytaires et phagocytaires représentent des mécanismes d'hétérophagie (Carruthers, 2015), à distinguer des différentes formes d'autophagie permettant la dégradation de composés intracellulaires. Les produits de dégradation hydrolytique lysosomale représentent des métabolites nécessaires aux réactions anaboliques des cellules. Ils seront utilisés suite à leur transport dans le cytosol (par des transporteurs à travers la membrane lysosomale, tels que LYAAT-1 (« *lysosomal amino acid transporter 1* ») (Sagné *et al.*, 2001), la sialine ou la cystinosine (Eskelinen *et al.*, 2003)).

En plus d'être impliqué dans le métabolisme cellulaire, le lysosome est également impliqué dans d'autres fonctions telles que l'homéostasie du cholestérol (Castellano *et al.*, 2017), et du calcium (Medina *et al.*, 2016), la réparation de la membrane plasmique par exocytose lysosomale (Reddy *et al.*, 2001), ainsi que, pour certains auteurs, l'apoptose via la libération de protéases telles que les cathepsines dans le cytoplasme suite à la perte de la perméabilité membranaire de l'organite (Figure 1.8.) (Appelqvist *et al.*, 2017).

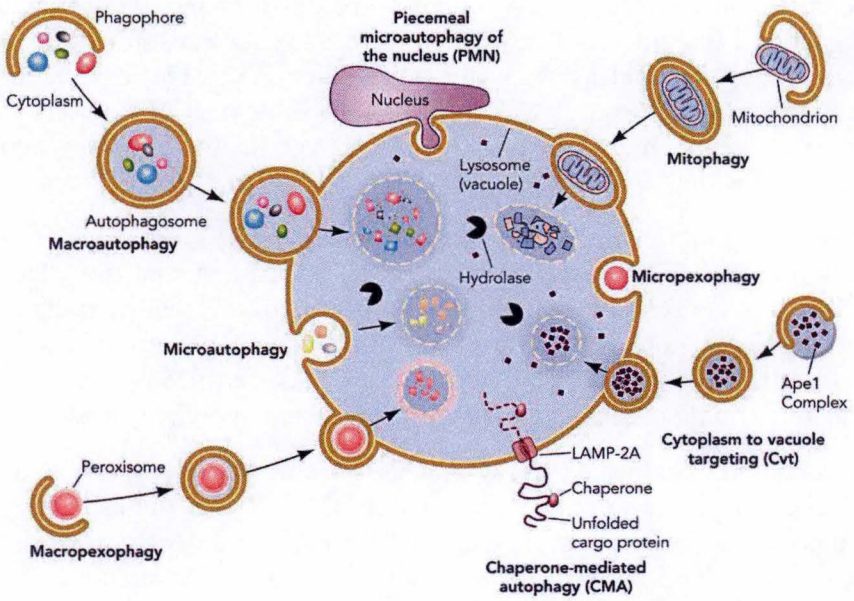


Figure 1.9. Voies d'autophagie sélectives et non-sélectives.

Il existe trois voies majeures de l'autophagie : la macro-autophagie impliquant l'internalisation du cargo suite à la formation d'autophagosomes, la micro-autophagie impliquant une internalisation directe du cargo par invagination de la membrane lysosomale, et l'autophagie médiée par des chaperonnes. En fonction du cargo destiné à être dégradé, l'autophagie peut être sélective en ciblant des organites tels que les mitochondries (mitophagie), les peroxisomes (pexophagie) ou le noyau ; ou non-sélective par l'internalisation de portions cytoplasmiques.
(Yen and Klionsky, 2008)

Tableau 1.3. Caractéristiques et fonctions des principales protéines ATG.

Protéine	*Étape de l'autophagie*	*Fonctions majeures*
ULK1/2 (ATG1)	*INDUCTION* Formation du complexe ULK	Ser/Thr kinase, recrutement de PI3K-III et d'ATG9
ATG13		Substrat de ULK1/2, médie l'activité du complexe ULK
FIP200 (ATG17)		Substrat de ULK1/2, médie l'activité du complexe ULK
Beclin 1 (ATG6)	*INDUCTION* Formation du complexe PI3K-III	Protéine adaptatrice du complexe PI3K-III
ATG14		Recrute le complexe PI3K-III au niveau des omégasomes
ATG2	*NUCLEATION* Formation du PAS	Interaction avec ATG18, fermeture de l'autophagosome
ATG9		Protéine intégrale membranaire, formation du PAS
ATG18		Recrute ATG2 en membrane du phagophore
ATG4	*ELONGATION* Complexe de conjugaison de LC3	Cystéine protéase, converti LC3 en LC3-I
ATG7		*E1-activating enzyme*, active ATG12 et LC3-I
ATG3		*E2-conjugating enzyme*, conjugue un PE à LC3-I
ATG10		*E2-conjugating enzyme*, conjugue ATG5 à ATG12
ATG5		*Sous-unité de l'E3-ubiquitin ligase* (avec ATG12 et 16)
ATG12		*Sous-unité de l'E3-ubiquitin ligase* (avec ATG5 et 16)
ATG16		*Sous-unité de l'E3-ubiquitin ligase* (avec ATG5 et 12)
LC3 (ATG8)	*ELONGATION*	Elongation du phagophore, interaction avec le cargo

(Réalisé à partir des articles de : Nakatogawa *et al.* (2009) et Lamb *et al.* (2013)

1.1.3.1.2.2. Autophagie : un suicide cellulaire médié par les lysosomes ?

L'autophagie, dont l'étymologie grecque signifie « se manger soi-même », est un processus catabolique durant lequel des éléments du cytoplasme d'une cellule sont dégradés par ses propres lysosomes (Ravikumar *et al.*, 2010). A l'état basal, l'autophagie a pour objectif de recycler les organites anciens ou endommagés, ainsi que les éventuels agrégats protéiques accumulés au sein de la cellule (Yang and Klionsky, 2010). Il existe trois grands types de voies autophagiques : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (Yen and Klionsky, 2008). La macro-autophagie implique l'internalisation de portions cytoplasmiques (organites et protéines cytoplasmiques) au sein de vésicules à double membrane, les autophagosomes, destinés à fusionner avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu. Grâce à des mécanismes spécifiques, la macro-autophagie peut cibler la plupart des organites intracellulaires, ce qui permet de les éliminer. Ce processus peut concerner les mitochondries (mitophagie), les péroxisomes (pexophagie), les lysosomes (lysophagie), et plus récemment le réticulum endoplasmique (réticulophagie), le noyau (nucléophagie) et même les ribosomes (ribophagie) (Cebollero *et al.*, 2012; Anding and Baehrecke, 2017). La micro-autophagie implique une internalisation directe de matériel cytoplasmique par le lysosome suite à une invagination de sa membrane, tandis que l'autophagie médiée par les chaperonnes implique la translocation trans-membranaire de protéines dénaturées dans le lysosomedans un processus qui requiert la participation de la protéine de membrane lysosomale LAMP-2 (Figure 1.9.).

L'autophagie est donc essentielle à l'homéostasie cellulaire, bien qu'elle puisse être régulée différentiellement en fonction de nombreux stress cellulaires. En effet, une déplétion en glucose et/ou acides aminés induit une stimulation des mécanismes autophagiques ce qui permet de compenser le manque de nutriments (Nnah *et al.*, 2015). Toutefois, une réponse autophagique excessive ou non-contrôlée n'est pas toujours bénéfique car elle marque l'inefficacité voire l'insuffisance de cette réponse et peut mener à la mort cellulaire. Le fait que le lysosome puisse être l'acteur de la mort cellulaire avait été annoncé par de Duve qualifiant cet organite de « *suicide bag* » (De Duve and Wattiaux, 1965). Depuis, de nombreuses études ont pu mettre en évidence l'interrelation entre les mécanismes d'autophagie et d'apoptose, notamment dans l'inhibition du développement de cellules cancéreuses (Eisenberg-Lemer *et al.*, 2009).

D'un point de vue mécanistique, l'autophagie est un continuum qui se divise artificiellement en différentes étapes successives : l'initiation, la formation du phagophore (nucléation et élongation membranaire du futur autophagosome), et la maturation de l'autophagosome suivie de la fusion avec les lysosomes, ou étape d'exécution (Yang and Klionsky, 2010 ; Kang *et al.*, 2011 ; Cicchini *et al.*, 2015; Klionsky *et al.*, 2016). En l'absence de nutriments, l'autophagie est, dans de nombreux types cellulaires, induite en réponse à l'activation du complexe ULK (« *unc-51 like autophagy activating kinase* ») qui résulte de l'inactivation de mTOR (« *mechanistic target of rapamycin* »), une sérine/thréonine kinase qui agit comme senseur moléculaire du statut énergétique de la cellule (Shimobayashi and Hall, 2014). L'activation du complexe ULK permet le recrutement des différents acteurs de l'autophagie, tels que les protéines ATG (« *autophagy-related proteins* ») dont il existe plusieurs représentants (Tableau 1.3.) (Nakatogawa *et al.*, 2009).

Le complexe ULK est constitué des sérine/thréonine kinases ULK1 et ULK2, ainsi que d'ATG13 et FIP200, essentielles à l'assemblage du complexe ULK. Son activation permet le recrutement de ATG9, la seule protéine ATG membranaire, dont la fonction présumée est de participer à l'apport des membranes qui formeront le futur autophagosome, et le complexe ATG2/ATG18. Le complexe ULK recrute également en membrane le complexe PI3K-III (« *phosphatidylinositol 3 kinase-class III* ») composé de la kinase Vps34 (« *vacuolar protein sorting 34* »), de Vps15 (« *vacuolar protein sorting 15* »), de Beclin-1 et d'ATG14 (Kang *et al.*, 2011). Le recrutement de ces complexes protéiques en membrane permet la nucléation du PAS (« *pre-autophagosomal structure* »). Les membranes destinées à former le PAS proviennent de vésicules ATG9-positives qui proviendraient du Golgi et/ou des

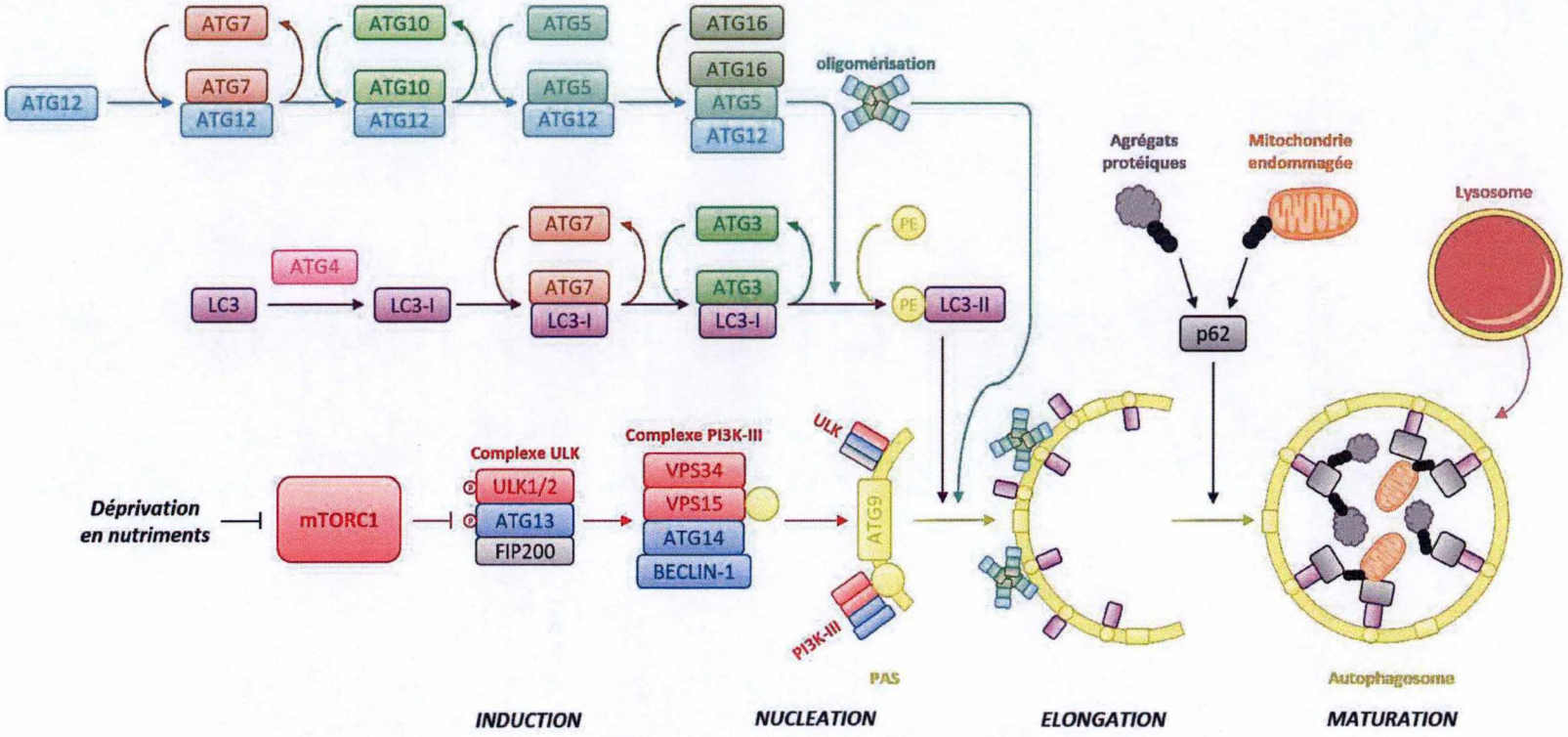


Figure 1.10. Mécanismes moléculaires de la formation de l'autophagosome.

En absence de nutriments (glucose, acides aminés, facteurs de croissance), l'inactivation du complexe mTORC1 permet l'induction des mécanismes autophagiques par l'activation du complexe ULK responsable du recrutement du complexe PI3K-III au niveau des oméga somes et MAMs, ainsi que d'ATG9 en membranes vésiculaires. Le recrutement de ces complexes permet la nucléation du PAS et la formation du phagophore. Parallèlement, deux systèmes de conjugaisons (les systèmes ATG7/10 et ATG7/3/12-5-16) sont mis en place afin de conjuguer un phosphatydiléthanolamine (PE) à la protéine LC3-I, dont la glycine carboxy-terminale a été clivée par ATG4. Cette conjugaison converti LC3-I (forme cytoplasmique) en LC3-II qui s'insère dans la membrane du phagophore, et permet son élongation. LC3-II agit comme un récepteur de protéines adaptatrices telles que p62 qui lie les motifs polyubiquitinés d'agrégats protéiques ou d'organites destinés à être dégradés. Suite à la fermeture de l'autophagosome, celui-ci fusionne avec les lysosomes. Ainsi, le cargo internalisé au sein de l'autophagolysosome est dégradé suite à l'action des hydrolases acides lysosomales.
(Réalisé à partir des articles de : Nakatogawa *et al.* (2009); Sarkar, (2013); Cicchini *et al.*, (2015) et Yang and Klionsky (2010))

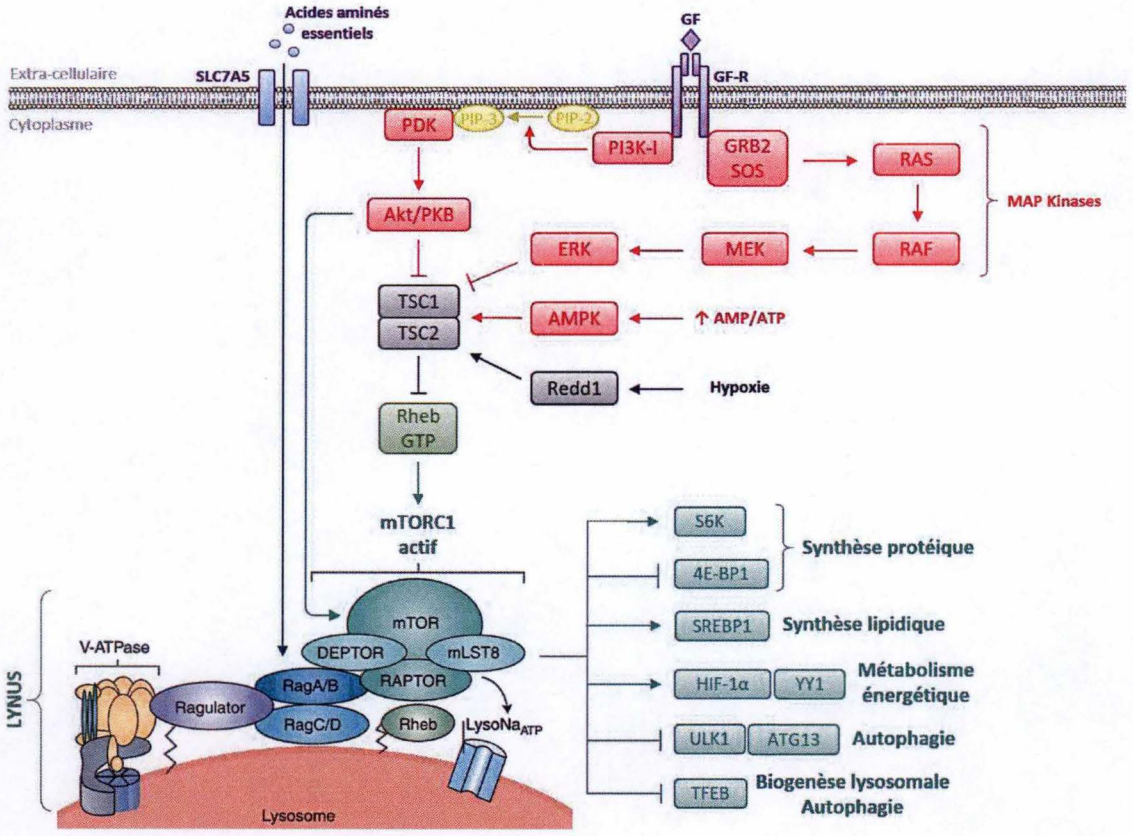


Figure 1.11. Voies de signalisation menant à la régulation du complexe mTORC1 et de ces cibles.

Le complexe mTORC1 est constitué de la sérine/thréonine kinase mTOR (« *mechanistic target of rapamycin* ») et des protéines régulatrices mLST8 (« *mammalian lethal with SEC thirteen 8* »), RAPTOR (« *regulatory-associated protein of mTOR* ») et DEPTOR (« *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* »). D'une part, le complexe mTORC1 peut être activé suite à une stimulation des cellules aux facteurs de croissances (GF) qui induisent les voies des MAPK (« *mitogen-associated protein kinase* ») et de PI3K (« *phosphatydilinositol-3-phosphate kinase* »), ainsi qu'en présence d'acides aminés essentiels par l'activation des GTPases RAG A/B et C/D. D'autre part, mTORC1 est inhibé suite à une diminution des réserves énergétiques (décrit par une augmentation du ratio [AMP]/[ATP]) ou en conditions d'hypoxie. Lorsqu'il est activé, le complexe mTORC1 s'associe à la membrane lysosomale pour former le complexe LYNUS (« *lysosome nutrient sensing* ») ou il peut réguler de nombreuses cibles impliquées notamment dans la synthèse de protéines et de lipides, le métabolisme énergétique, l'autophagie et la biogenèse lysosomale.
(Réalisé à partir des articles de : Settembre and Ballabio (2011); Sarkar (2013); Simobayashi and Hall (2014) et Nnah *et al*, (2015))

endosomes, ainsi qu'en majeure partie des omégasomes. Les omégasomes sont des extensions digitiformes du réticulum endoplasmique (RE) situées proche de points de connexion entre RE et les mitochondries, les MAMs (« *mitochondria-associated ER membranes* ») à l'interface desquelles les complexes ULK et PI3K-III peuvent interagir (Lamb *et al.*, 2013 ; Giorgi *et al.*, 2015). Suite à la formation du PAS, deux systèmes de conjugaison (« *ubiquitin-like* ») sont recrutés ce qui permet de médier la « lipidation » de la forme cytosolique de LC3 (« *light chain 3* ») en LC3-II (forme liée à un groupe phosphatidyléthanolamine). Cette « lipidation » permet l'incorporation de LC3-II dans la membrane du PAS, et ainsi l'élongation membranaire du phagophore (Tanida *et al.*, 2004 ; Kang et al., 2011) (Figure 1.10.). LC3-II se localise à la surface interne du phagophore et y agit comme un récepteur de p62-SQSTM1 (« *sequestosome 1* »), une protéine reconnaissant les motifs ubiquitine des protéines destinées à être dégradées (Pankiv *et al.*, 2007). De cette manière, les agrégats protéiques et organites destinés à être dégradés et porteurs de ces marqueurs protéiques ubiquitinylés sont internalisés au sein de l'autophagophore une fois que les extrémités du phagophore ont fusionné. L'étape finale est la maturation de l'autophagosome suite à la fusion avec le lysosome (médiée par la petite protéine G Rab7 et des SNAREs (« *soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor* »)) ce qui permet la dégradation du cargo et la mise à disposition des métabolites produits par le catabolisme lysosomal (Ravikumar *et al.*, 2010).

1.1.3.1.3. Biogenèse et régulation des fonctions lysosomales : la voie mTOR

De plus en plus d'études ont établi le rôle central de mTOR dans la régulation des fonctions lysosomales (Settembre *et al.*, 2012 ; Nnah *et al.*, 2015 ; Castellano *et al.*, 2017). mTOR interagit avec d'autres protéines pour former des complexes tels que mTORC1 et mTORC2. Etant donné que les fonctions de mTORC2 sont moins bien connues, seules les caractéristiques intrinsèques au complexe mTORC1 seront décrites dans cette section.

mTORC1 est constitué de mTOR (sous-unité catalytique), de RAPTOR (« *regulatory-associated protein of mTOR* »), et de mLST8 (« *mammalian lethal with SEC thirteen 8* ») (Ravikumar *et al.*, 2010 ; Nnah *et al.*, 2015). Il existe deux grands mécanismes qui mènent à l'activation de mTORC1 : l'axe « TSC1/2 - Rheb » et l'axe « acides aminés - Rag » (Figure 1.11.). L'axe « TSC1/2 - Rheb » est constitué du complexe hétérodimérique TSC1/2 (« *tuberous sclerosis 1 and 2* ») agit comme une GAP (« *GTPase-activating protein* ») qui inhibe l'activation de mTORC1 suite à la conversion de la forme active de la petite protéine G Rheb (« *RAS homolog enriched in brain* » - liée au GTP) en forme inactive (lié au GDP), ainsi incapable d'activer mTOR (Nnah *et al.*, 2015). Le complexe TSC1/2 est lui-même activé en réponse à des conditions stressantes telles que l'hypoxie ou l'activation de l'AMPK (« *AMP-activated protein kinase* ») suite à un statut énergétique altéré (ratio [AMP]/[ATP] élevé), conduisant à l'inhibition de mTOR (Nnah *et al.*, 2015). Inversément, le complexe TSC1/2 est inhibé par les voies de signalisation PI3K-I/Akt (« *phosphatidylinositol 3 kinase-class I / protein kinase B* »), et par la voie des MAPK (« *mitogen-activated protein kinases* ») activées en réponse aux facteurs de croissance, permettant l'activation de mTOR (Shimobayashi and Hall, 2014). Akt peut également activer directement mTOR par phosphorylation sur le résidu Ser2448 (Nave *et al.*, 1999). L'axe « acides aminés - Rag » est plus court et implique l'activation des petites protéines G de la famille Rag (RagA/B et RagC/D) en présence d'acides aminés tels que la glutamine et la leucine (Shimobayashi and Hall, 2014). Les Rag jouent le même rôle que Rheb et activent mTORC1 (Sancak *et al.*, 2011).

Lorsqu'il est activé, le complexe mTORC1 est associé à la membrane lysosomale grâce aux petites protéines G Rheb, RagA/B et RagC/D (Sancak *et al.*, 2011). Le complexe mTORC1-Rheb-Rag interagit avec le complexe Ragulator ainsi qu'avec les V-ATPases (Colaço and Jäättelä, 2017; Pu *et al.*, 2017), ce qui constitue un complexe appelé LYNUS (« *lysosomal nutrient sensing* ») (Settembre and Ballabio, 2014) (Figure1.11.). Les lysosomes apparaissent donc comme des plateformes d'activation de mTORC1 lui permettant d'agir sur ces nombreuses cibles. mTORC1 stimule notamment la synthèse protéique en activant les protéines S6K (« *ribosomal protein S6 kinase* ») par

phosphorylation sur le résidu Thr389, et 4E-BP1 (« *eIF4E-binding protein 1* ») par phosphorylation sur les résidus Thr37, Thr46, Ser65, Thr70, Ser83, Ser101, and Ser112 (Showkat *et al.*, 2014). De plus, l'activation de mTORC1 inhibe l'initiation de l'autophagie en phosphorylant ATG13 sur le résidu Ser258, empêchant ainsi la formation du complexe ULK nécessaire à la formation du phagophore (Nakatogawa *et al.*, 2009; Puente *et al.*, 2016). L'activation de mTORC1 induit également la phosphorylation inhibitrice de TFEB (« *transcription factor EB* »), un facteur de transcription essentiel à la biogenèse lysosomale (Settembre *et al.*, 2013). Cette phosphorylation (sur le résidu Ser211) provoque une inhibition de TFEB par séquestration dans le cytoplasme, via la liaison de TFEB phosphorylé à des protéines 14-3-3 (Roczniak-Ferguson *et al.*, 2012). Lorsque mTORC1 est inactivé en absence de nutriments, la translocation nucléaire de TFEB est permise (Settembre *et al.*, 2012). A noter que la déphosphorylation de TFEB, provoquant sa déséquestration, est catalysée par la phosphatase calcineurine. Dans le noyau, TFEB se lie directement à la séquence CLEAR (« *coordinated lysosomal expression and regulation* ») présente notamment au niveau des promoteurs de la majorité des gènes coodant pour des protéines lysosomales (Napolitano and Ballabio, 2016). TFEB induit ainsi l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse lysosomale (hydrolases lysosomales, LAMP-1, V-ATPases, Rag, etc), et contrôle également l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'autophagie (des protéines ATG, p62), et de gènes impliqués dans la biogenèse des mitochondries comme PGC-1α (« *PPARγ coactivator 1α* ») (Settembre and Ballabio, 2011).

1.1.3.2. La mitochondrie

1.1.3.2.1. Structure des mitochondries : l'unité isolée

La mitochondrie, dont l'étymologie grecque signifie « granule filandreux », représente l'un des plus anciens organites acquis par les cellules eucaryotes et proviendrait de l'évolution complexe d'α-protéobactéries internalisées par des cellules anaérobiques pré-eucaryotiques il y a environ 2 millions d'années (Friedman and Nunnari, 2014). L'intégration et le maintien au cours de l'évolution de ces structures bactériennes au sein des cellules anaérobiques fut probablement favorisé par le bénéfice considérable que représentait la présence de la bactérie en termes de production d'énergie, en particulier l'apport d'un métabolisme aérobique autorisant une bien plus rentable production d'ATP comparée au métabolisme glycolytique anaérobie (Nelson and Cox, 2013).

Les mitochondries sont des organites, sphériques ou allongés, délimités par deux bicouches phospholipidiques séparées d'un espace intermembranaire (EIM) et contenant selon les auteurs entre 1000 et 1500 protéines différentes (Nelson and Cox, 2013; Calvo *et al.*, 2016). Ces deux membranes diffèrent de par leurs structures, leurs compositions. La membrane mitochondriale externe (MME) est une membrane perméable, constituée de canaux et transporteurs tels que VDAC (« *voltage-dependent anion channel* ») permettant les échanges de métabolites avec le cytosol, ou les TOMs (« *translocase of the outter membrane* ») impliqués dans l'importation de protéines mitochondriales membranaires (Walther and Rapaport, 2009). La membrane mitochondriale interne (MMI) est une membrane imperméable plus riche en protéines et présentant une composition lipidique riche en cardiolipine (Ren *et al.*, 2014). La MMI est également caractérisée par ses nombreuses invaginations appelées « crêtes mitochondriales » (« *cristae* » en anglais) (Palade, 1953). Ces crêtes mitochondriales permettent d'accroitre la surface de la MMI et sont le siège de la production d'ATP par phosphorylations oxydatives (OXPHOS) (Nelson and Cox, 2013). En effet, les crêtes mitochondriales abritent les super-complexes protéiques (I à IV) de la chaîne de transporteurs d'électrons (CTE) ainsi que la Fo-F1-ATPase. La MMI est aussi constituée de canaux et transporteurs tels que les ANTs (« *adenine nucleotide translocators* ») impliqués dans les échanges ADP/ATP entre l'EIM et la matrice, et les TIMs (« *translocase of the inner membrane* ») impliqués dans l'importation de protéines matricielles (Walther and Rapaport, 2009). La matrice mitochondriale, quant à elle, renferme de nombreuses enzymes impliquées dans les fonctions mitochondriales (voir point 1.1.3.2.2.), ainsi que d'un génome

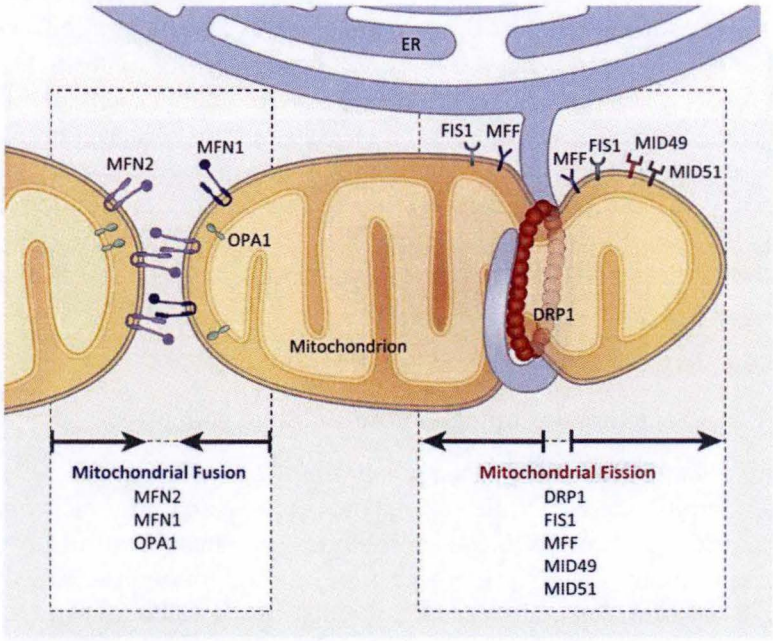


Figure 1.12. Acteurs moléculaires impliqués dans les mécanismes de fusion et de fission mitochondriale.

La fusion des mitochondries est médie par les GTPases MFN1 et MFN2 (« *mitofusin 1/2* ») présent dans la MME (membrane mitochondriale externe). Ces GTPases ont un domaine cytoplasmique « *coiled coil* » ce qui permet l'interaction entre MFN de mitochondries proches. L'activité GTPase des MFN induit la formation d'hétérodimères, ce qui favorise la proximité des MME et leur fusion. La fusion des MMI (membrane mitochondriale interne) a ensuite lieu suite à l'interaction des GTPases OPA1 (« *optic atrophy 1* ») situées en MMI. La fission des mitochondries à lieu à proximité des zones de contact avec le reticulum endoplasmique qui forme des tubules autour des mitochondries, ce qui permet le recrutement de la GTPase DRP-1 (« *dynamin-related protein 1* ») capable de se lier à différents récepteurs de la MME tels que FIS1 (« *fission 1* »), MFF (« *mitochondrial fission factor* »), MiD49 (« *mitochondrial dynamics protein 49* ») ou MiD51 (« *mitochondrial dynamics protein 51* »). Le recrutement de DRP-1 induit sa polymérisation formant un anneau constricteur autour des mitochondries. La dynamine 2 est une GTPase qui vient ensuite finaliser la constriction et la fusion des MME et MMI et former ainsi deux mitochondries.
(Sebastián *et al.*, 2017)

mitochondrial (ADNmt) (Nelson and Cox, 2013). Au cours de leur adaptation au sein des cellules eucaryotes, les mitochondries ont perdu la majeure partie de leur génome initial et ont gardé un génome circulaire d'environ 16,5 kilobases présent en plusieurs copies (Gray *et al.*, 1999). L'ADNmt code pour 13 peptides impliqués dans les complexes des OXPHOS (à l'exception du complexe II), 22 ARN de transfert et 2 ARN ribosomiques (12S et 16S) (Ventura-Clapier *et al.*, 2008 ; Wenz, 2013). La grande majorité des protéines mitochondriales est codée par le génome nucléaire (ADNn) auquel a été transféré une partie du génome mitochondrial ancestral durant l'évolution, nécessitant une coordination parfaite de l'expression entre les deux génomes (Gray *et al.*, 1999).

1.1.3.2.2. Structure des mitochondries : un réseau dynamique

La vision classique de la structure des mitochondries, vues comme unités isolées dans le cytoplasme, ne reflète toutefois pas totalement la réalité. En effet, avec l'arrivée des techniques de marquages à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques des mitochondries sur cellules vivantes, des chercheurs ont mis en évidence que les mitochondries pouvaient se scinder ou fusionner continuellement (Bereiter-Hahn and Voth, 1994). Ainsi, les mitochondries s'organisent plutôt en un réseau dynamique et hétérogène en 3 dimensions, qui se calque sur le réseau de microtubules et du RE (Sukhorukov and Meyer-Hermann, 2015). Leur morphologie, fonction du type cellulaire, du métabolisme énergétique, de l'état de différenciation et de l'état de stress de la cellule, dépend de l'équilibre entre des mécanismes de fission et de fusion. L'équilibre entre fission et fusion peut être modifié en fonction du statut énergétique et à son tour affecter l'homéostasie énergétique et métabolique de la cellule (van der Bliek *et al.*, 2013).

D'un point de vue mécanistique (Figure 1.12.), la fission des mitochondries est médiée par le RE capable de former des tubules autour des mitochondries, formant ainsi des sites de constriction facilitant le recrutement de la machinerie protéique de la fission mitochondriale. Les principales protéines orchestrant la fission des mitochondries sont FIS1 (« *fission 1* ») un récepteur mitochondrial de la MME qui reconnaît la GTPase cytoplasmique DRP1 (« *dynamin-related protein 1* »). En se polymérisant autour du site de constriction de la mitochondrie, DRP-1 est responsable du recrutement et de l'activation des dynamines 1 et 2 qui finalisent la fission des mitochondries (Giorgi *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016). DRP-1 est une protéine cytoplasmique et de nombreuses modifications post-traductionnelles régulent son recrutement vers la membrane mitochondriale (Chang and Blackstone, 2017). Ces modifications incluent : 1) la phosphorylation inhibitrice sur le résidu Ser637 par la PKA (« *protein kinase A* ») et la CaMKIα (« Ca^{2+}*/calmodulin-dependent protein kinase I α* ») qui induit une diminution de l'activité GTPase de DRP-1 et/ou une inhibition de sa translocation en membrane mitochondriale; 2) la phosphorylation activatrice sur le résidu Ser616 par le couple Cdk1/cycline B responsable de la division des mitochondries et de leur distribution lors du cycle cellulaire (cytocinèse); 3) La S-nitrosylation, une modification redox des groupements thiols par le $NO^{\cdot}$ sur le résidu Cys644 de DRP-1 induit également la fission mitochondriale en présence de stress oxydatif; et 4) la SUMOylation et l'ubiquitination (modifications de DRP-1 encore peu connues) permettant une meilleure interaction de DRP-1 avec les autres acteurs de la machinerie de fission (Chang and Blackstone, 2017). La phosphorylation de DRP-1 sur le résidu Ser367, l'un des marqueurs protéiques les plus étudiés dans le cadre de la fission mitochondriale, est notamment diminuée en présence d'un excès de ROS, d'ATP, ou de calcium (traduisant un stress mitochondrial) (Cho *et al.*, 2010; Kaddour-Djebbar *et al.*, 2010). D'autres couples de la MME tels que MiD49(« *mitochondrial dynamics protein 49* »)/DRP-1, MiD51(« *mitochondrial dynamics protein 51* »)/DRP-1 ou MFF(« *mitochondrial fission factor* »)/DRP-1 peuvent également induire la fission mitochondriale (Hall *et al.*, 2014).

D'autre part, les mécanismes de fusion mitochondriales sont médiés par les GTPases MFN1 et MFN2 (« *mitofusin 1/2* ») associées à la MME et qui hydrolysent le GTP ce qui conduit à la formation des complexes hétérodimériques facilitant la fusion des MME de particules mitochondriales proches

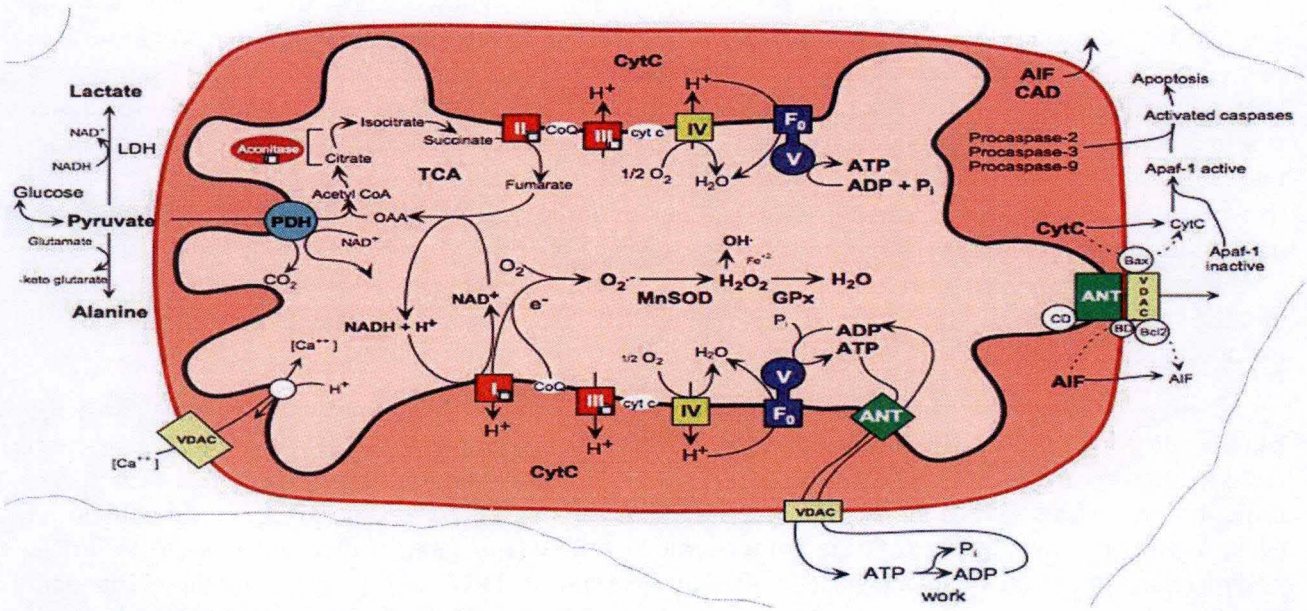


Figure 1.13. Majeures fonctions métaboliques de la mitochondrie.

La fonction majeure de la mitochondrie est la production d'énergie sous forme d'ATP grâce à l'activité des complexes de la chaîne de transporteurs d'électrons (CTE) et de la Fo-F1-ATPase. Les électrons qui alimentent la CTE proviennent d'équivalent réducteurs tels que le NADH et le $FADH_2$ notamment produits par le cycle de Krebs (TCA – « *tricarboxylic acid cycle* ») ou par la PDH (« *pyruvate dehydrogenase* »). Le schéma présente également d'autres rôles de la mitochondrie comme : 1) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) suite à la fuite des électrons des complexes I et III de la CTE; 2) la régulation de l'homéostasie calcique de la cellule en agissant comme réserve de calcium grâce aux canaux VDAC (« *voltage-dependentanion channel* »); et 3) l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose suite à la libération du cytochrome C de l'espace intermembranaire vers le cytoplasme. Cette libération de cytochrome C est permise grâce à la formation de canaux constitués de VDAC et de l'ANT (« *adenine nucleotide translocators* ») stabilisés par la protéine pro-apoptotique BAX (« *BCL-2-associated X protein* »).
(MitoMap.org, 2002)

(Hall et al., 2014). Tout comme pour la MME, la fusion des MMI implique l'activité des GTPases comme OPA1 (« *optic atrophy 1* ») (van der Bliek *et al.*, 2013).

La fission du réseau mitochondrial (causée par l'activation des effecteurs de la fission ou une inhibition des acteurs de la fusion) engendre des mitochondries présentant des capacités métaboliques ralenties, notamment pour les OXPHOS et une augmentation de la production de ROS, alors que l'état ramifié et plus allongé du réseau mitochondrial est le reflet d'une augmentation de la production d'ATP et d'une diminution de production de ROS (Picard *et al.*, 2013 ; Friedman and Nunnari, 2014). Cependant, la fragmentation du réseau mitochondrial présente certains avantages puisqu'elle permet l'élimination des mitochondries dépolarisées endommagées (mitophagie) (Westermann, 2010). La fission mitochondriale peut également être induite suite à des stimuli pro-apoptotiques. En effet, l'activation des protéines pro-apoptotiques BAK et BAX associées à la MME, capables d'inhiber MFN2, de stabiliser la liaison de DRP-1 aux récepteurs FIS1, MiD4/51 ou MFF, et de rompre les oligomères OPA1 (qui séquestrent le cytochrome C dans l'EIM) induisant ainsi la libération de cytochrome C dans le cytoplasme et une réponse apoptotique (Hall *et al.*, 2014). Toutefois, certaines études récentes montrent que la fragmentation mitochondriale limite l'apoptose en compartimentant les dépolarisations ou les influx de calcium néfastes (Simoni *et al.*, 2004).

1.1.3.2.3. Fonctions générales des mitochondries : la production d'énergie et de ROS

Les mitochondries possèdent de nombreuses fonctions métaboliques telles que : 1) la formation des équivalents réducteurs $FADH_2$ (flavine adénine dinucléotide) et NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) notamment dans le cycle de Krebs; 2) la β-oxydation des acides gras; 3) le cycle de l'urée; 4) la biosynthèse de centres fer-soufre [Fe-S]; 5) l'homéostasie du calcium, 6) la contribution à l'état redox de la cellule par la production de ROS, et 7) l'induction de l'apoptose (Collins *et al.*, 2012) (Figure 1.13.). Toutefois, la fonction métabolique majeure des mitochondries est la production d'ATP (source majeure d'énergie pour la cellule) par les OXPHOS (Senior, 1988). L'activité de la Fo-F1-ATPase dépend d'un gradient électrochimique de protons (H^+) répartis de part et d'autre de la MMI, généré lors des réactions d'oxydo-réductions au niveau des complexes I, III et IV de la CTE. Ces complexes se transfèrent successivement les électrons du NADH et du $FADH_2$ afin d'en retirer l'énergie ce qui permet de pomper des protons H^+ de la matrice vers l'espace intermembranaire. En fin de chaîne, la cytochrome C oxydase (complexe IV) oxyde le cytochrome C et produit les électrons nécessaires à la réduction du dioxygène (O_2) en eau (H_2O) (Nelson and Cox, 2013). Le gradient électrochimique de protons est d'ailleurs responsable de l'apparition d'un potentiel membranaire mitochondrial compris entre -180 et -200 mV en conditions normopolarisées (Gerencser *et al.*, 2012).

Les mitochondries sont également des acteurs clé dans la production de ROS et de RNS, parfois considérés comme des molécules uniquement délétères (en fonction de la nature des ROS et de leurs concentrations), mais jouant un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire assurant la survie, la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires (Lee *et al.*, 2011), mais aussi la régulation de l'immunité innée, et l'homéostasie mitochondriale (Collins *et al.*, 2012). En effet, les ROS peuvent stimuler la biogenèse mitochondriale en activant les facteurs de transcription NRF1 et 2 (« *nuclear respiratory factors* ») (voir point 1.1.3.2.4.1.) (Yoboue and Devin, 2012). Avec les NADPH oxydases, les mitochondries sont à l'origine de la majeure partie des ROS et RNS présent au sein des cellules et représentent des nœuds de signalisation importants pour la signalisation redox (Andreyev *et al.*, 2005). Le principal ROS produit par les mitochondries est le radical anionique superoxyde ($O_2^{\cdot(-)}$) formé selon la réaction : $\boldsymbol{O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot(-)}}$ (Gardès-Albert *et al.*, 2003). La CTE est la source principale de production d'$O_2^{\cdot(-)}$ due à la fréquente fuite d'électrons des complexes I et III (Görlach *et al.*, 2015). Les autres sources mitochondriales menant à la production d'$O_2^{\cdot(-)}$ sont les flavoenzymes pyruvate déshydrogénase (PDH) et l'α-kétoglutarate déshydrogénase (KGDH), et la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Görlach *et al.*, 2015). L'$O_2^{\cdot(-)}$ est le point de départ de la

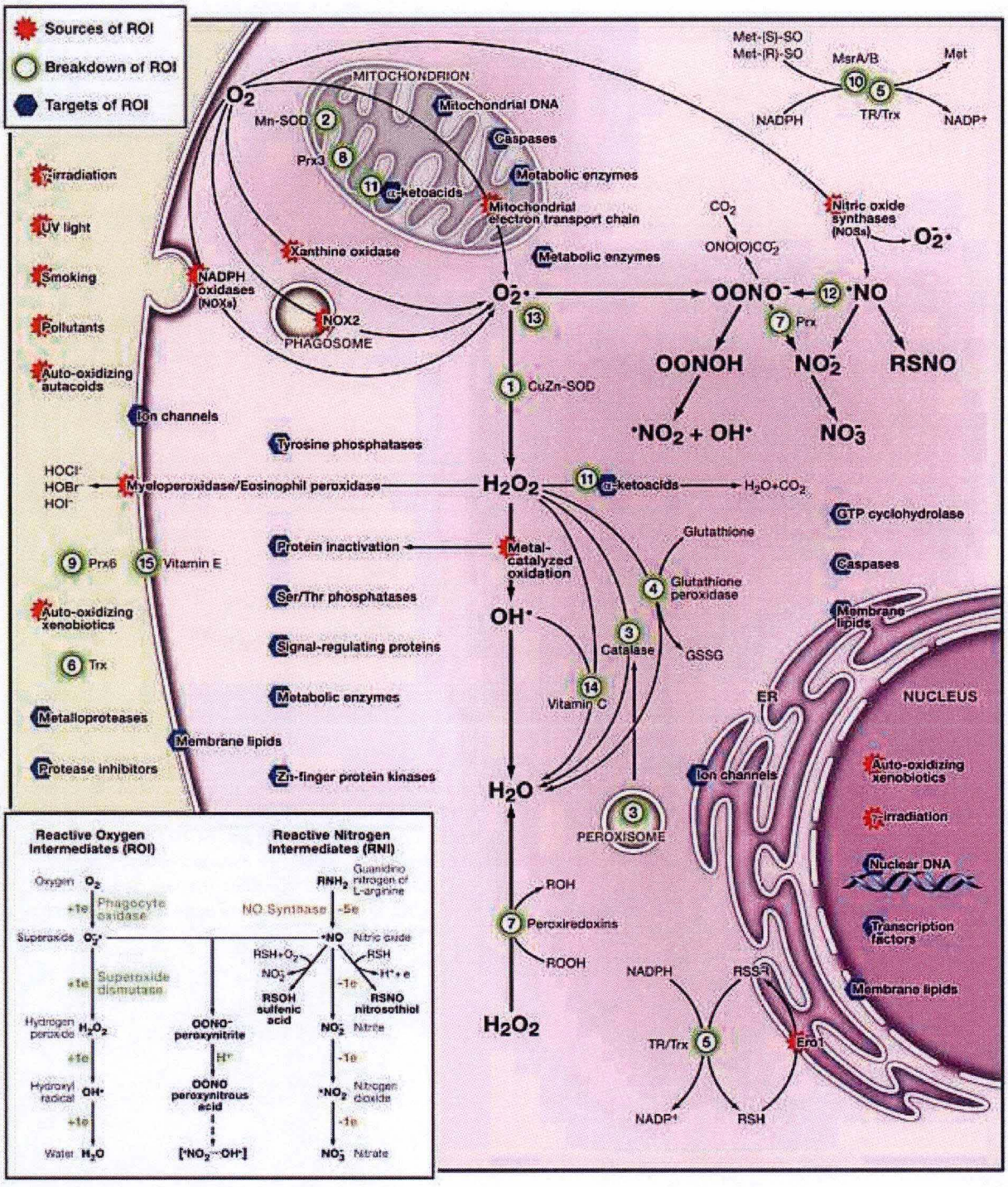


Figure 1.14. Origine, cibles et inhibiteurs des principaux ROS et RNS mitochondriaux.

Les sources des espèces radicalaires de l'oxygène (ROI/ROS) et du nitrogène (RNI/RNS) sont représentées avec une icône rouge, les cibles des ROS et RNS sont représentés avec une icone bleue, et les mécanismes anti-oxydants sont représentés avec une icône verte et regroupent principalement des enzymes anti-oxydantes telles que les SOD (« *superoxide dismutase* »), les PRX (« *peroxyredoxin* »), les TRX (« *thioredoxin* »), la glutathion peroxydase, la catalase peroxisomale, ainsi que des des molécules anti-oxydantes telles que la vitamine C (ou acide ascorbique). (Nathan and Ding, 2010)

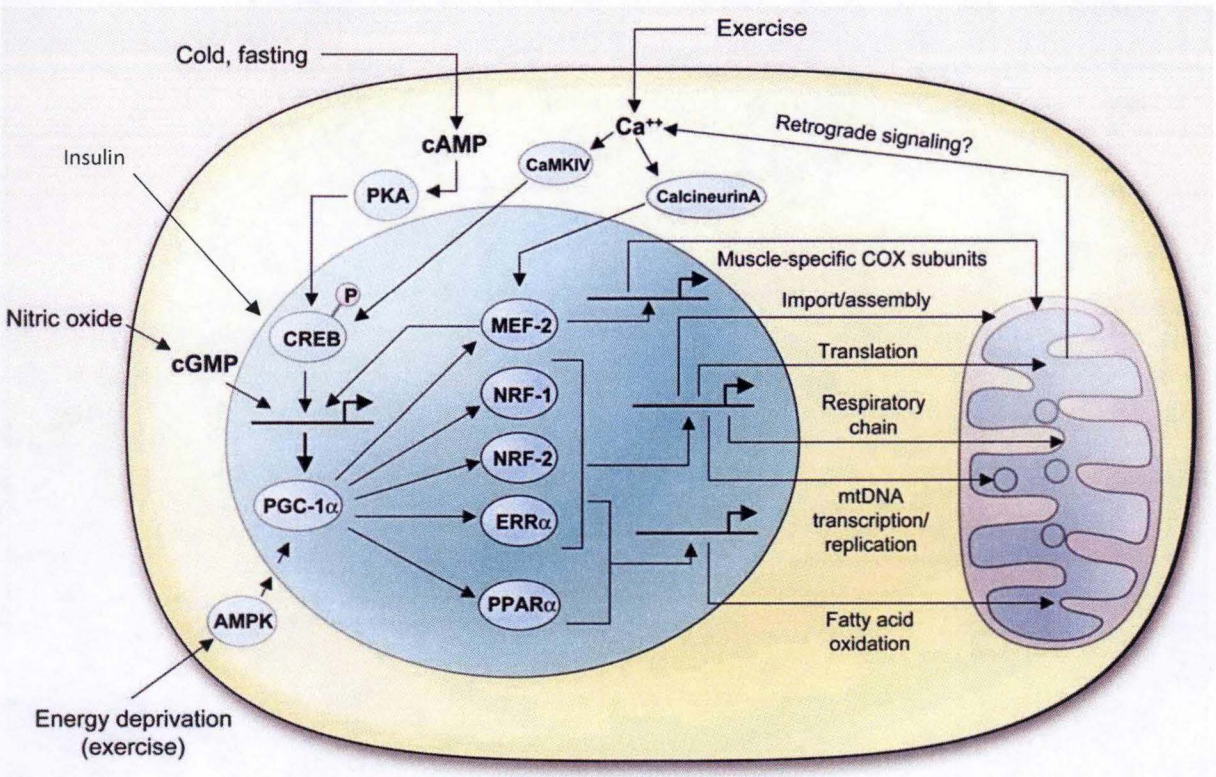


Figure 1.15. Voies de signalisation menant à l'activation de PGC-1α et de ces cibles durant la biogenèse mitochondriale.

PGC-1α (« *PPAR gamma coactivator 1 α* ») est le co-activateur transcriptionnel majoritairement impliqué dans les mécanismes de biogenèse mitochondriale suite à des stimuli exogènes tels qu'une déprivation énergétique, la présence d'insuline ou d'oxyde nitrique (NO), l'exercice physique, une diminution de la température. PGC-1α active notamment les facteurs de transcription NRF-1 et -2 (« *nuclear respiratory factor 1/2* »), ERRs (« e*strogen-related receptors*) et PPARs (« *peroxisome proliferator-activated receptor* ») impliqués dans l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans : 1) la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial; 2) la traduction des protéines encodées par le génome mitochondrial; 3), l'importation des protéines encodées par l'ADN nucléaire; 4) la chaîne de transporteurs d'électroins (complexe II de la CTE) et 5) la β-oxydation des acides gras.
(Scarpulla, 2008)

production d'autres ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par dismutation spontanée ou catalysées par les SOD (« *superoxyde dismutase* »), et le radical hydroxyl ($HO^·$) produit selon la réaction de Fenton : $\boldsymbol{H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^· + Fe^{3+} + HO^-}$ (Gardès-Albert *et al.*, 2003). L'$O_2^{·(-)}$ mène aussi à la production de RNS tels que le peroxynitrite ($OONO^-$) en réagissant avec le $NO^·$ (Nathan and Ding, 2010). Vu que les ROS et RNS sont des métabolites très réactifs pouvant induire des dommages au niveau des protéines, lipides et acides nucléiques (Gardès-Albert *et al.*, 2003), l'évolution biologique a permis l'émergence de nombreux acteurs antioxydants tels que l'acide ascorbique (vitamine C), le glutathion ou les catalases (Nathan and Ding, 2010) (Figure 1.14.). C'est l'équilibre entre les mécanismes pro- et antioxydants qui détermine le statut nocif ou bénéfique des ROS/RNS.

1.1.3.2.4. Homéostasie mitochondriale : équilibre entre biogenèse et mitophagie

Vu leurs fonctions à la fois essentielles (production d'ATP) et parfois délétères (production excessive de ROS), la régulation de l'abondance, de la dynamique et de l'activité des mitochondries doit être finement contrôlée et résulte essentiellement d'un équilibre entre biogenèse mitochondriale et mitophagie (Palikaras and Tavernarakis, 2014), mais également d'un contrôle de la qualité des protéines mitochondriales, par l'action de chaperonnes et de protéases, respectivement responsables de la bonne conformation des protéines et de la dégradation d'agrégats protéiques (Michel *et al.*, 2011).

1.1.3.2.4.1. Mécanismes moléculaires régulant la biogenèse mitochondriale

Vu la répartition duale des gènes mitochondriaux au niveau nucléaire (ADNn) et mitochondrial (ADNmt), les processus de biogenèse mitochondriale nécessitent une synchronisation et une coordination des mécanismes de réplication de l'ADNmt, de la synthèse de protéines codées par l'ADNmt et l'ADNn, et de l'adressage, de l'importation et de l'assemblage de protéines mitochondriales codées par l'ADNn et ce en respectant une parfaite stoechiométrie (Wenz, 2013).

Les protéines codées par les gènes de l'ADNn et adressées aux mitochondries sont transloquées dans la mitochondrie par les complexes TOM (« *translocase of the outer mitochondrial membrane* ») et TIM (« *translocase of the inner mitochondrial membrane* ») (Wiedemann *et al.*, 2004). Bien qu'il existe de nombreuses voies d'importation de protéines mitochondriales, la voie classique nécessite la présence d'une séquence d'adressage sur la protéine d'intérêt (Harbauer *et al.*, 2014). Cette séquence est reconnue par les récepteurs TOM20 et TOM22, afin de faciliter la translocation de la protéine d'intérêt à travers la MME utilisant le canal TOM40, une protéine de type « *β-barrel* » (Becker *et al.*, 2012). Une fois dans l'EIM, et en fonction de la destination finale de la protéine d'intérêt, différentes voies sont envisageables (Harbauer *et al.*, 2014).

L'expression de gènes nucléaires impliqués dans la biogenèse et les fonctions mitochondriales est régulée par de nombreux facteurs de transcription tels que les NRF 1 et 2 (« *nuclear respiratory factors 1/2* »), les ERRs (« *estrogen-related receptors* »), les PPARs (« *peroxisomal proliferator-activated receptor* »), ainsi que par les coactivateurs transcriptionnels de la famille PRC (« *PGC1-related co-activators* ») tels que PGC-1α (« *PPARγ coactivator 1α* ») ayant pour fonction principale de contrôler l'activation des facteurs de transcriptions cités ci-dessus, et représentant ainsi le régulateur clé de la biogenèse mitochondriale (Figure 1.15.) (Wenz, 2013 ; Palikaras and Tavernarakis, 2014). La fonction de PGC-1α est régulée au niveau transcriptionnel ainsi qu'au niveau post-traductionnel (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011 ; Wenz, 2013). L'expression de PGC-1α est induite par des facteurs de transcription tels que YY1 (« *ying yang 1* ») activé par la voie mTORC1/TFEB, ou CREB (« *cAMP response element-binding* ») activé en présence de glucagon (dans le foie), en réponse à une dérégulation de la concentration en calcium (lors d'un effort physique), ou suite à une diminution de température (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011). PGC-1α est également régulé au niveau post-traductionnel par phosphorylation par l'AMPK et par désacétylation par la SIRT1 (« *silent information regulator 1* », une déacétylase dépendante du NAD^+) en réponse à un stress énergétique (Cantó and

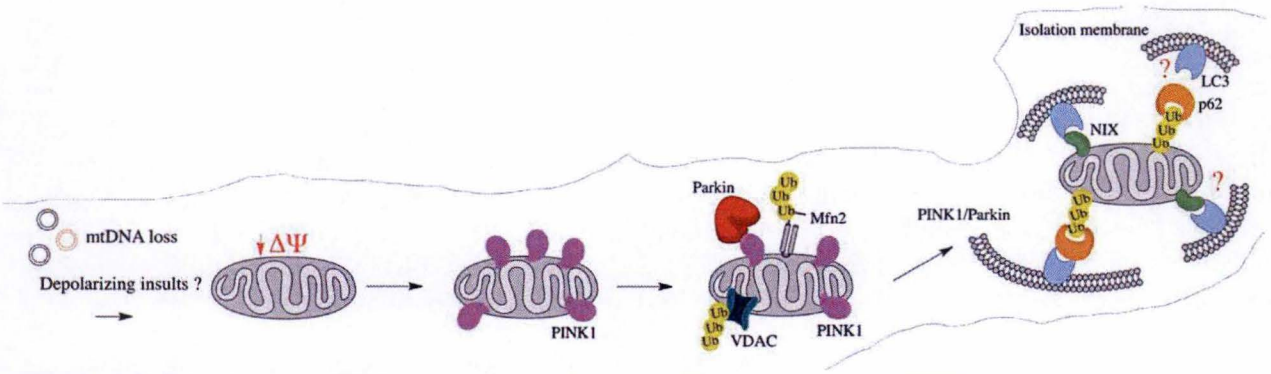


Figure 1.16. Mécanismes moléculaires de la mitophagie médiée par le système « PINK1-parkin ».

La mitophagie est un type d'autophagie sélective ciblant des mitochondries présentant une diminution de leur potentiel membranaire ou une perméabilisation membranaire perturbée qui résulte en une perte de l'ADN mitochondrial. Ces altérations induisent la stabilité et l'accumulation de la sérine/thréonine kinase PINK1 (« *PTEN-induced putative kinase 1* ») au niveau de la membrane mitochondriale externe (MME). PINK1 recrute et active la parkine, une E3 ubiquitine ligase, capable de polyubiquitiner des protéines de la MME telles que les mitofusines (MFN2) ou VDAC (« *voltage-dependent anion channel* »). Ces motifs ubiquitinés sont notamment reconnus par la protéine adaptatrice p62 qui est elle-même reconnue par les récepteurs LC3-II présents dans les membranes des phagophores, ce qui permet de former l'autophagosome.
(Grenier *et al.*, 2013)

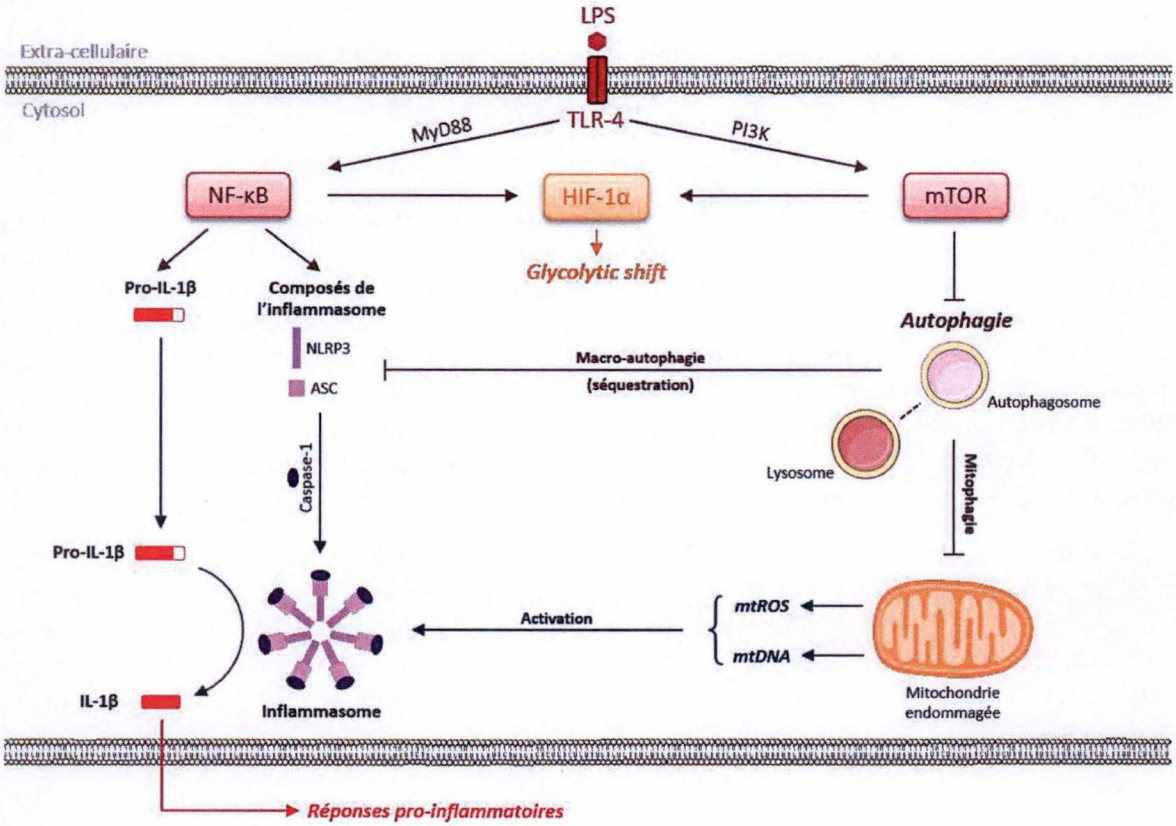


Figure 1.17. Rôles des lysosomes et mitochondries dans les fonctions pro-inflammatoires des macrophages stimulés par le LPS.

Le LPS induit une réponse pro-inflammatoire des macrophages en modulant les fonctions lysosomales et mitochondriales via l'activation de mTOR. Le LPS induit ainsi une inhibition de l'autophagie et donc de la séquestration des composés de l'inflammasome dont l'expression est sous le contrôle du facteur de transcription NF-κB. L'inhibition des mécanismes autophagiques induit également une accumulation de mitochondries endommagées, ce qui provoque une libération d'ADN mitochondrial et de ROS mitochondriaux responsables de l'activation de l'inflammasome impliqué dans la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β.
(Réalisé à partir des articles de : Harris *et al.* (2017) et Kabat & Pierce (2017))

Auwerx, 2009 ; Scarpulla, 2011). Ces mécanismes régulent la translocation nucléaire et l'activité du co-activateur.

1.1.3.2.4.2. Mécanismes moléculaires de la mitophagie

Comme nous l'avons vu, la mitophagie est un type d'autophagie dirigée spécifiquement contre les mitochondries permet de dégrader les mitochondries endommagées ou superflues ce qui assure une homéostasie des fonctions mitochondriales. La mitophagie est également importante au niveau développemental, lors l'élimination des mitochondries durant la différenciation des érythrocytes, durant la maturation des cellules du cristallin, ou encore lors la dégradation des mitochondries dérivées du spermatozoïde après fusion avec l'ovocyte (Palikaras and Tavernarakis, 2014).

Les différents mécanismes pouvant mener à la mitophagie sont classés en deux catégories : les voies dépendantes ou indépendantes de l'ubiquitine (Figure 1.16.) (Georgakopoulos et al., 2017). Le système le plus étudié dans la voie dépendante de l'ubiquitine est la voie dépendante du couple « PINK1-parkine ». Les mitochondries endommagées voient généralement leur potentiel membranaire diminuer , permettant la stabilisation et l'accumulation de la sérine/thréonine kinase PINK1 (« *PTEN-induced putative kinase 1* ») dans la MME (Palikaras and Tavernarakis, 2014). PINK1 active ensuite la parkine (une E3 ubiquitine ligase) par phosphorylation sur le résidu Ser65, responsable de la polyubiquitination de protéines de la MME telles que VDAC ou MFN1 (Ding and Yin, 2013). Ces protéines ubiquitinées sont ensuite reconnues par des protéines adaptatrices telles que p62 ou OPTN (« *optineurin* ») permettant le recrutement de membranes du phagophore par une interaction avec LC3-II, formant ainsi un autophagophore autour des mitochondries ciblées (Georgakopoulos *et al.*, 2017). Les voies indépendantes de l'ubiquitine menant à la mitophagie sont plus diversifiées et peuvent impliquer la présence des protéines NIX (« *NIP3-like protein X* ») et BNIP3 (« *BCL2/adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein 3* ») à la surface de la mitochondrie, mais aussi l'externalisation de la cardiolipine en MME, tous étant des signaux moléculaires reconnus par LC3-II et donc favorisant la mitophagie (Georgakopoulos *et al.*, 2017).

1.1.3.3. Altération des fonctions lysosomales et mitochondriales dans un contexte inflammatoire : la stimulation des macrophages au LPS

La mise en place d'un contexte inflammatoire dans le cadre d'études menées sur des macrophages peut être mimée par une stimulation de ces derniers à l'aide de LPS (Ip *et al.*, 2017). De nombreuses études ont rapporté les mécanismes activés et/ou modifiés dans la cellule suite à une stimulation des TLR4 par le LPS (Mills and O'Neill, 2016; Kabat and Pearce, 2017), Ces études ont également mis en évidence un rôle non-négligeable des organites tels que le lysosome et la mitochondrie dans les mécanismes pro-inflammatoires.

Le LPS est un PAMP provenant de la paroi externe de bactéries Gram négative, capable de se lier au TLR 4 des macrophages (Janeway and Medzhitov, 2002). La stimulation par le LPS déclenche notamment deux voies majeures de signalisation (parmi d'autres) : la voie NF-κB et la voie mTOR (Figure 1.17.) (Andreakos *et al.*, 2004 ; Kabat and Pearce, 2017). La stimulation du TLR 4 induit l'activation du facteur de transcription NF-κB via l'activation de MyD88 (« *myeloid differentiation protein 88* ») (Andreakos *et al.*, 2004). NF-κB est un régulateur clé de la réponse inflammatoire. Il induit notamment l'expression de gènes codant pour des précurseurs de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (comme les pro-IL-1β et pro-IL-18), des constituants de l'inflammasome (dont NLRP3 (« *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3* ») (Anand *et al.*, 2011), ainsi que la COX2 (« *cyclooxygenase 2* ») responsable de la production de prostaglandines (López-Armada *et al.*, 2013). Dans des conditions basales, les constituants de l'inflammasome sont séquestrés dans des vésicules et/ou dégradés par autophagie (Harris *et al.*, 2017). Suite à une stimulation par le LPS, la voie PI3K-Akt-mTORC1 est activée, induisant l'inhibition des mécanismes d'autophagie et permettant ainsi l'assemblage des constituants de l'inflammasome. L'inhibition des mécanismes autophagiques (dont

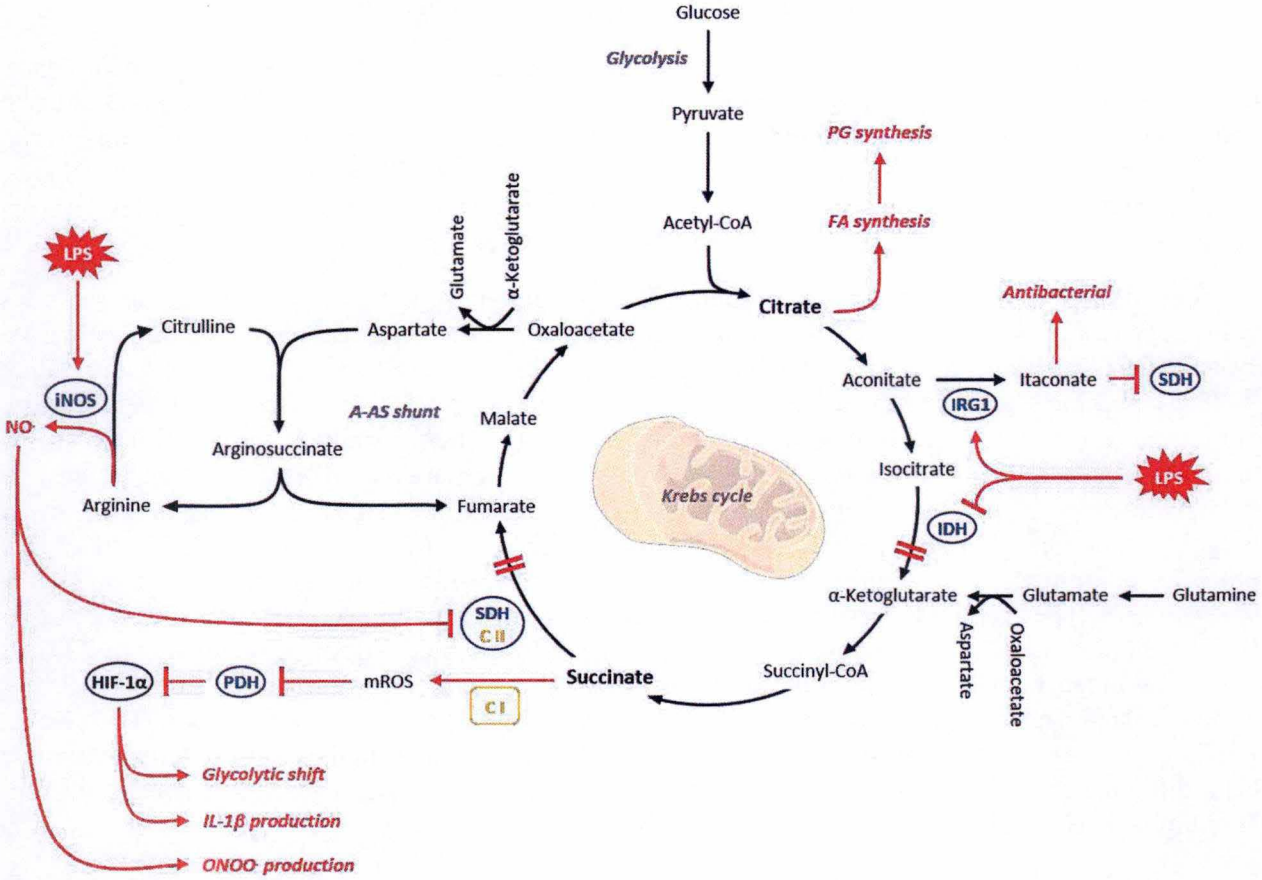


Figure 1.18. Modification du métabolisme des macrophages stimulés par le LPS.

Une stimulation des macrophages par le LPS induit une reprogrammation du métabolisme mitochondrial en générant deux points d'interruption dans le cycle de Krebs. En effet, le LPS induit une diminution de l'expression de l'IDH2 (« *isocitrate dehydrogenase* ») et une augmentation de l'expression du gène *IRG1* (« *immunoregulatory genre 1* ») codant pour l'aconitate décarboxylase qui converti l'aconitate en itaconate. Une diminution de l'activité de l'IDH2 induit une accumulation d'isocitrate, d'aconitate, mais aussi de citrate capable de sortir de la mitochondrie et d'alimenter la voie de synthèse des prostaglandines inflammatoires (PG). L'itaconate est un métabolite antibactérien qui est également impliqué dans l'inhibition de l'activité de la SDH (« *succinate dehydrogenase* ») qui joue un rôle à la fois dans le cycle de Krebs et dans la chaîne de transporteurs des électrons (CTE) (complexe II). L'inactivation de la SDH génère une accumulation de succinate pouvant mener à la production de ROS mitochondriaux (mROS) suite au transport reverse d'électrons médié par le complexe I de la CTE, ce qui diminue l'activité des phosphorylations oxydatives. Les mROS sont aussi impliqués dans l'inhibition de l'activité de la PDH (« *prolyl hydroxylase* »), levant ainsi l'inhibition sur HIF-1α. Le facteur de transcription HIF-1α induit notamment un shift glycolytique et une production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β. Vu les deux interruptions présentes au niveau du cycle de Krebs en présence de LPS, les niveaux d'α-ketoglutarate et de fumarate doivent être restaurés par des réactions anaplérotiques. La réserve en α-ketoglutarate est rétablie grâce à l'A-AS (aspartate-arginosuccinate) shunt. Ces réactions mènent à la production d'arginine qui sera ensuite converties en citrulline grâce à l'iNOS (« *inducible nitric oxide synthase* ») dont l'expression est augmentée en présence de miel. Cette réaction déclenche enfin la production de NO· capable de former du peroxynitrite ($ONOO^-$) avec le radical anionique superoxyde($O_2^{\cdot(-)}$). De plus, le NO· est aussi impliqué dans l'inhibition de l'activité de la SDH.
(Réalisé à partir des articles de : EL Kasmi *et al.* (2015); Mills and O'Neill (2016) et Sancho *et al.* (2017))

la mitophagie) suite à l'activation de mTOR par le LPS provoque également l'accumulation de mitochondries endommagées et une augmentation de la production de ROS et RNS mitochondriaux et d'ADNmt dans le cytoplasme des macrophages (López-Armada *et al.*, 2013 ; Kabat & Pearce, 2017). Ces mécanismes sont à mettre en relation avec l'induction de la fission mitochondriale par le LPS qui induit une diminution de l'abondance de MFN1 et de la phosphorylation de DRP-1 sur le résidu Ser637 (Park *et al.*, 2013 ; Baker *et al.*, 2014). Les ROS mitochondriaux et l'ADNmt libérés dans le cytosol, tout comme l'externalisation de la cardiolipine, contribuent à l'activation de l'inflammasome permettant la libération de cytokines pro-inflammatoires matures comme l'IL-1β et l'IL-18 (Iyer *et al.*, 2013 ; López-Armada *et al.*, 2013) .

Dans un contexte plus métabolique, les macrophages stimulés au LPS présentent également un shift glycolytique aérobie principalement dû à l'induction de l'expression de HIF-1α (« *hypoxia inducible factor 1 α* ») suite à l'activation de NF-κB et de mTOR par le LPS (Görlach and Bonello, 2008 ; Weichhart *et al.*, 2015). En effet, HIF-1α favorise la voie glycolytique en augmentant l'expression de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse, ainsi qu'en assurant la translocation de GLUT1 (« *glucose transporter 1* ») en membrane du macrophage (Weichhart *et al.*, 2015). De plus, le LPS engendre deux modifications au niveau du cycle de Krebs suite à l'inhibition de l'IDH 2 (« *isocitrate dehydrogenase 2* ») et de la SDH (« *succinate dehydrogenase* ») Cette reprogrammation métabolique, aussi appelée « immunométabolisme », induit une production de ROS mitochondriaux (Sancho *et al.*, 2017), de NO· (EL Kasmi and Stenmark, 2015) et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-1β) (Figure 1.18.). (Mills *et al.*, 2017)

1.2. Le miel : de la ruche au monde médical

Depuis des milliers d'années, et dès l'Egypte Ancienne, le miel est reconnu pour ses propriétés bénéfiques en médecine traditionnelle, et est utilisé pour guérir des blessures cutanées ou des maux intestinaux (Zumla and Lulat, 1989). Bien qu'à l'époque, les cibles et modes d'action du miel n'étaient pas connus, de nombreuses équipes de chercheurs ont plus récemment essayé de mettre en évidence les principes actifs responsables des effets thérapeutiques du miel.

1.2.1. Processus de fabrication du miel par les abeilles

Le miel est une substance organique produite par les abeilles appartenant à l'espèce *Apis spp.*, parmi lesquelles le genre *Apis mellifera* est le plus répandu (Crane, 1991). Les matières premières utilisées pour la fabrication du miel sont le miellat (une substance visqueuse sécrétée par des insectes comme les pucerons) ou le nectar. Le nectar est une substance sécrétée par les nectaires (glandes spécialisées retrouvées à la base des pièces florales de la plupart des angiospermes) ou par des trichomes spécialisés (De la Barrera and Nobel, 2004). Le nectar est dérivé du phloème, un tissu conducteur véhiculant la sève élaborée destinée à nourrir les différents organes de la plante. Tout comme la sève élaborée, le nectar est principalement composé d'eau et de saccharose, ainsi que d'autres sucres minoritaires. En plus du pollen, le nectar représente une source importante de l'alimentation des abeilles (Crane, 1991). Celles-ci vont le stocker dans leur jabot et le transporter vers la ruche, où il sera pris en charge par d'autres abeilles et stocké à long terme, faisant office de provisions pour l'hiver. Le nectar est ainsi transmis d'abeille en abeille et subit des modifications en termes de viscosité et de composition chimique et protéique suite au contact renouvelé avec la salive des abeilles. Le nectar est ainsi enrichi en enzymes et stocké dans des alvéoles de cire où il sera maturé (De la Barrera and Nobel, 2004). La maturation du nectar en miel dure quelques jours et consiste en l'élimination de la majorité de son eau par évaporation, un processus facilité par les battements d'ailes des abeilles ventileuses. Une fois la proportion d'eau descendue à environ 18 %, l'alvéole de miel mature est recouverte de cire, permettant ainsi la conservation du miel à l'abri de la fermentation et de la prolifération bactérienne (Crane, 1991).

1.2.2. Composition générale du miel

La composition du miel est assez variable et dépend de nombreux facteurs tels que les espèces florales utilisées et sélectionnées par les abeilles, qui dépendent elles-mêmes de la région géographique et du climat local (Missio da Silva *et al.*, 2016). De plus, la composition du miel peut être modifiée de par la variabilité interindividuelle des abeilles ou par la présence de contaminants tels que le pollen ou des pesticides et herbicides (tels que le glyphosate) qui sont, eux-aussi, transportés dans la ruche.

1.2.2.1. Hydrates de carbone et dérivés organiques

Le miel est majoritairement constitué d'hydrates de carbone, et est caractérisé par sa forte teneur en monosaccharides (75% en masse) parmi lesquels le fructose et le glucose sont les plus abondants (Saha, 2015; Missio da Silva *et al.*, 2016). Certains disaccharides tels que le saccharose, le maltose ou le tréhalose sont présents en faible concentrations puisqu'ils ne représentent pas plus de 15%.

Durant sa maturation et son stockage dans la ruche, mais également après exploitation, le miel va subir de légères modifications au niveau de sa composition en sucres et dérivés organiques. Ces modifications correspondent principalement à une réaction non-enzymatique entre des groupements aminés et des sucres réducteurs (hydrates de carbones possèdant un groupement aldéhydique) (Hellwig and Henle, 2014). De telles réactions font partie des réactions de Maillard. Ces réactions produisent des composés dicarbonylés qui seront ensuite convertis en aldéhydes (volatils ou non) durant la réaction de la réaction de Strecker avec des acides aminés. Ces réactions produisent ainsi de nombreux composés responsables des arômes, goûts, et apparences des aliments durant leurs stockage ou leur cuisson (Hellwig and Henle, 2014). Vu que le miel contient à la fois des sucres et des acides aminés, il contient également certains produits des réactions de Maillard et de Strecker tels que le méthylglyoxal (MGO ou aldéhyde pyruvique) (Kwakman *et al.*, 2010). Le MGO peut également provenir de la conversion non-enzymatique de trioses comme le dihydroxyacétone présent dans le nectar des fleurs (Atrott *et al.*, 2012). La teneur en MGO varie fortement d'un miel à l'autre, en fonction de l'origine du nectar utilisé (Stephens *et al.*, 2010).

1.2.2.2. Acides aminés et protéines

Le miel contient aussi, en faibles proportions, des acides aminés et des protéines (moins de 1%) provenant principalement du pollen et du nectar des fleurs, mais également des sécrétions des glandes salivaires des abeilles lors de la conversion du nectar en miel (Saha, 2015; Missio da Silva *et al.*, 2016). La majorité des acides aminés sont présents sous forme libre dans le miel, et l'acide aminé le plus abondant est la proline qui représente 50 à 85 % de l'ensemble des acides aminés (Missio da Silva *et al.*, 2016).

La fraction protéique présente dans le miel est principalement constituée d'enzymes et de peptides antimicrobiens. La majorité des enzymes retrouvées dans le miel sont impliquées dans le catabolisme des sucres telles que l'amylase, l'invertase, et la glucose oxydase (Saha, 2015; Missio da Silva *et al.*, 2016). L'amylase hydrolyse les polysaccharides de type amidon en monosaccharides (glucose) ou disaccharides (maltose). L'invertase hydrolyse le saccharose en glucose et fructose. La présence de cette enzyme dans le miel explique donc sa forte teneur en fructose et glucose. La glucose oxydase est impliquée dans le catabolisme du glucose en acide gluconique (principal acide présent dans le miel) et produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon la réaction : $\boldsymbol{Glucose + O_2 \rightarrow Acide\ gluconique + H_2O_2}$ (Kwakman and Zaat, 2012; Saha, 2015). Selon les variétés florales, certains miels sont également composés d'enzymes antioxydantes telles que la catalase et la superoxyde dismutase (SOD) (Vallianou *et al.*, 2014). En plus de ces enzymes, le miel contient également des défensines, des peptides cationiques antibactériens produits par les glandes hypopharyngiennes des abeilles (Kwakman and Zaat, 2012).

1.2.2.3. Flavonoïdes et Vitamines

Les flavonoïdes forment une classe de polyphénols caractérisés par une structure générale C6-C3-C6 correspondant à deux cycles benzèniques reliés par un cycle pyrane, et sont largement répandus dans le monde végétal (Missio da Silva *et al.*, 2016). Les flavonoïdes sont également composés de groupements hydroxyles leur conférant une activité antioxydante importante car ils sont capables de neutraliser les radicaux libres hydroxyles $HO^{\cdot}$ et le peroxynitrite ($ONOO^{-}$) (Heim *et al.*, 2002; Vallianou *et al.*, 2014). Le miel contient une grande variété de flavonoïdes originaires du nectar des plantes, tels que la lutéoline, l'apigénine, la quercétine, et la chrysine (Saha, 2015). D'autres composés à haut pouvoir anti-oxydant retrouvés dans le miel sont les vitamines C (acide ascorbique) et E (α-tocophérols) (Vallianou *et al.*, 2014).

En conclusion, la composition complexe d'un miel est à la base de ses propriétés et de ses vertus que nous allons décrire ci-dessous.

1.2.3. Propriétés biologiques et curatives du miel

1.2.3.1. Propriétés antibactériennes

1.2.3.1.1. Acidité

Le miel possède un pH très bas compris entre 3,2 et 4,5 (Alvarez-Suarez *et al.*, 2014). Ce pH acide est dû à la présence de plusieurs acides dont, principalement l'acide gluconique, produit suite à l'oxydation du glucose par la glucose oxydase. L'acidité du miel est un des facteurs contribuant à l'effet bactéricide du miel puisque le pH optimum pour la croissance bactérienne est généralement compris entre 7,2 et 7,4 (Missio da Silva *et al.*, 2016). De plus, l'acidité du miel permet une meilleure guérison de plaies (ulcères et brûlures généralement caractérisés par un environnement alcalin) (Al-waili *et al.*, 2011). En effet, l'acidification d'une plaie par le miel facilite la libération d'oxygène par l'hémoglobine et procure un milieu favorable à la prolifération de fibroblastes, un type cellulaire important pour la cicatrisation (Alam *et al.*, 2014).

1.2.3.1.2. Stress osmotique

Vu sa composition riche en monosaccharides et sa faible teneur en eau, le miel est une solution hyperosmotique qui engendre un stress osmotique pour les micro-organismes (Vallianou *et al.*, 2014). Le miel engendre également un environnement défavorable pour la croissance bactérienne en entravant la disponibilité en eau dont les molécules restent associées aux sucres par des liaisons hydrogène (Alam *et al.*, 2014).

1.2.3.1.3. Stress oxydatifs : la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Selon les variétés, le miel peut contenir un taux important de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) provenant du catabolisme du glucose en acide gluconique par la glucose oxydase (Kwakman *et al.*, 2010). Lorsque le miel a atteint sa maturité, l'activité de la glucose oxydase est inhibée, tandis que son activité est augmentée dans du miel non-mature ou dilué. La présence de H_2O_2, une agent oxydatif pouvant induire de nombreux dommages cellulaires (voir Figure 1.13.) permettrait ainsi de prévenir la prolifération bactérienne lorsque la teneur en sucres est trop faible que pour présenter des propriétés hyperosmotiques et bactéricides (Mahmoud and Owayss, 2006; Kwakman and Zaat, 2012).

1.2.3.1.4. Glycation des protéines

La glycation des protéines est un processus correspondant à la réaction non-enzymatique de sucres réducteurs avec des résidus aminés (comme l'arginine et la lysine) des protéines menant à la formation de produits de glycation avancés (AGE – « *advanced glycation end-products* ») (Hellwig and Henle, 2014). La glycation des protéines peut mener à des dysfonctionnements au niveau de la structure et de la fonction des protéines, et constitue un des mécanismes conduisant aux pathologies telles que le diabète de type II et les maladies neurodégénératives (Ulrich and Cerami, 2001). Le méthylglyoxal retrouvé dans le miel est un des précurseurs menant à la formation d'AGE, conférant ainsi au miel des propriétés bactéricides supplémentaires (Kwakman *et al.*, 2010).

1.2.3.1.5. Défensines des abeilles

Les défensines sont de petits peptides (29 à 50 acides aminés) cationiques constitués d'un domaine hydrophile et d'un domaine hydrophobe (Ganz, 2004). Cette structure rappelle celle des phospholipides retrouvés dans les membranes cellulaires, y compris les membranes bactériennes. Les défensines vont étroitement interagir avec les phospholipides membranaires et s'accumuler à la surface des bactéries, jusqu'à former des pores et mener à la mort de la bactérie. Les défensines présentes dans le miel lui confèrent ainsi des propriétés bactéricides supplémentaires (Kwakman and Zaat, 2012).

1.2.3.2. Propriétés immunomodulatrices

En plus des effets antioxydants intrinsèques aux flavonoïdes et aux vitamines C et E présents dans le miel lui conférant des propriétés anti-inflammatoires, de nombreuses études ont été menées sur des modèles cellulaires et animaux afin d'étudier l'effet du miel sur la réponse inflammatoire et l'efficacité de la réparation tissulaire (Tonks *et al.*, 2003; Al-waili *et al.*, 2011; Hussein *et al.*, 2012; Raynaud *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2014; Kalantari *et al.*, 2016; Almasaudi *et al.*, 2017).

D'une part, des études menées sur des macrophages (lignées RAW264.7 ou BMDM (« *bone-marrow derived macrophages* »)) ont montré que le miel induit une augmentation de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα, l'IL-6 et l'IL-1β (Tonks *et al.*, 2003; Kalantari *et al.*, 2016). D'autres études ont mis en évidence que cette surexpression de cytokines pro-inflammatoires serait médiée par une activation du facteur de transcription NF-κB en présence de miel (Raynaud *et al.*, 2013). Toutefois, à ce jour et à notre connaissance, les composés du miel responsables de ces effets pro-inflammatoires au niveau du macrophage sont encore inconnus.

Par contre, des études menées sur des BMDM traités avec des flavonoïdes du miel comme la chrysine, la quercétine, l'apigénine et la lutéoline, montrent une inhibition de l'activité de l'iNOS ainsi qu'une diminution de l'abondance de la forme phosphorylée d'IκB, menant à une inhibition de l'activité de NF-κB (Comalada *et al.*, 2006). Plus spécifiquement, la chrysine induirait également l'acquisition du phénotype M2 par les macrophages (Feng *et al.*, 2014). Ces auteurs attribuent donc des propriétés anti-inflammatoires au miel de par sa composition en flavonoïdes.

D'autre part, des études menées sur des modèles murins de l'inflammation ont montré qu'un traitement au miel présente des propriétés anti-inflammatoires. En effet, le miel permet d'accélérer la guérison de rats souffrant d'ulcères gastriques induits par injection d'acide acétique (Almasaudi *et al.*, 2017). Cette étude montre également que le miel induit une diminution de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, l'IL-1β et l'IL-6) ainsi qu'une augmentation de l'activité antioxydante de la SOD et de la catalase des muqueuses gastriques. Les effets anti-inflammatoires de la chrysine ont également été montrés dans des modèles inflammatoires murins d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, effets qui seraient médiés par une diminution de l'expression de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires, l'iNOS, NF-κB et COX-2 (Yao *et al.*, 2014).

Bien que les résultats concernant les effets pro- et/ou anti-inflammatoires du miel divergent respectivement entre les modèles *in vitro* et *in vivo*, il est important de rester critique face à ces études. En effet, le choix du modèle utilisé peut influencer les résultats. En effet, il y a une grande différence entre l'analyse des effets du miel spécifiquement sur les macrophages (*in vitro*), ou l'analyse de ces effets dans un modèle murin (*in vivo*) qui intègre mieux tous les aspects de l'inflammation d'un point de vue physiologique. En outre, l'ensemble des études réalisées dans ce contexte n'utilisent pas forcément la même variété de miel, ce qui peut engendrer une variabilité supplémentaire dans les résultats obtenus sachant que la composition du miel varie d'un type à l'autre. Il est également important de noter que les études menées sur les flavonoïdes « purs » exploitent des concentrations souvent bien plus importantes que celles observées dans le miel.

Finalement, une hypothèse générale ressort de l'ensemble de ces études. Le miel ne serait pas un agent uniquement pro-inflammatoire, ni uniquement anti-inflammatoire, mais bien un agent immunomodulateur. En effet, le miel stimulerait les fonctions des macrophages dans les réponses pro-inflammatoires, ce qui permet la mise en place de réponses anti-inflammatoires et de réparation tissulaire accélérées et plus efficaces. Le processus de cicatrisation de lésions est ainsi favorisé en présence de miel, notamment en raison de ses nombreuses propriétés antibactériennes.

1.3. Objectifs et contextualisation du mémoire

Comme expliqué dans l'introduction, les organites tels que les lysosomes et mitochondries sont impliqués dans les fonctions inflammatoires des macrophages. En outre, le miel possède de nombreuses propriétés modulatrices sur les mécanismes de l'inflammation. Toutefois, les effets putatifs du miel sur les fonctions des lysosomes et mitochondries dans un contexte inflammatoire ou non n'ont encore jamais été étudiés. Dans le cadre de ce mémoire, le miel Revamil® a été choisi. Le Revamil® est un miel médical standardisé et prescrit pour ses effets bactéricides et cicatrisants bien décrits (Kwakman *et al.*, 2008 ; Kwakman *et al.*, 2011; Kwakman *et al.*, 2011; Kwakman and Zaat, 2012).

L'objectif principal de ce mémoire était donc de **tester les effets potentiels du miel Revamil® sur la biologie des lysosomes et mitochondries dans deux lignées cellulaires de macrophages** : les RAW264.7 et les THP-1. Dans un deuxième temps, nous nous sommes également intéressés à **étudier les effets modulateurs éventuels du Revamil® sur la réponse inflammatoire de macrophages stimulés par le LPS.**

Ce mémoire ouvre un tout nouveau projet de recherche collaboratif entre l'URBC et l'URPhym, et ne reposait sur aucune donnée préliminaire obtenue par les laboratoires d'accueil.

MATERIELS ET METHODES



Figure 2.1. Le miel Revamil®.

Le miel Revamil® est un miel médical utilisé, dans sa forme gel, pour ses propriétés bactéricides et cicatrisantes, notamment conférées par sa composition riche en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (5,5 mM) ainsi qu'en défensines-1 provenant des abeilles. Le Revamil® contient également du méthylglyoxal (MGO : 0,25 mM) présent en moindre quantité comparé à d'autres miels comme le miel Manuka. Néanmoins, cette concentration est non-négligeable et le MGO contribue également aux propriétés anti-bactériennes du Revamil® (Kwakman *et al.*, 2010).

Tableau 2.1. Composition de la solution contrôle appelée « Sugar Mix » dans ce travail.

Sucres	*Poids moléculaire (g/mol)*	*Concentration (g/kg de miel) Kwakman et al., 2010*	*Concentration d'utilisation (mM)*
Glucose (Merck, Germany)	180,2	333	15
Fructose (Sigma, USA)	180,2	385	17
Saccharose (Sigma, USA)	342,3	73	2
Maltose (Sigma, USA)	342,3	62	1

Les concentrations d'utilisation des différents sucres représentent celles retrouvées dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de la solution contrôle « Sugar Mix ». Cette concentration a été établie aux cours des analyses d'optimisation des conditions expérimentales durant ce mémoire (voir Résultats, point 3.1.)

Tableau 2.2. Réactifs et matériels nécessaires au repiquage des cellules RAW264.7.

Matériel	*RAW264.7*
Milieu de culture	**DHG-L1** - DMEM High glucose (4,5 g/L) (Gibco, USA) - 1,5 g/L $NaHCO_3$ (Merck, Germany)
Sérum	**10% Sérum inactivé par la chaleur (SIC)** Sérum de veau foetal (Gibco, USA) décomplémenté à 56°C durant 30 min
Matériel supplémentaire	- Boîtes de culture T75 (75 cm) (Corning-Costar, USA) - Pipettes stériles (Corning-Costar, USA) - Grattoirs (TPP, Switzerland)

2. MATERIELS et METHODES

2.1. Miel Revamil®

2.1.1. Origine et production du Revamil®

Le miel Revamil® (Figure 2.1.) est un miel de qualité médicale produit et commercialisé par la firme Bfactory Health Products (Rhenen, Pays-Bas), principalement étudié pour ses propriétés anti-bactériennes (Kawakman *et al.*, 2011) et prescrit pour soigner des plaies aigües (chirurgicales et brûlures sévères), chroniques et infectées (ulcères cutanés) (Van Eijk and Groenhart, 2006). Le Revamil® fut développé à l'Université et Wageningen (Pays-Bas) et y est produit dans des serres sous des conditions contrôlées et standardisées afin de préserver une activité antibactérienne reproductible d'un lot à l'autre. En effet, le miel Revamil® est élaboré à partir de champs d'une composition polyflorale sélectionnée et constante, constituée de sept plantes dont le thym, le romarin, la lavande, le sarrasin et la phacélie (la firme ne communique pas la nature des deux dernières plantes) (Le Bihan, 2016). Afin d'éviter toute contamination potentielle par des spores bactériennes, le miel Revamil® est stérilisé par irradiation aux rayons gamma, n'altérant en rien les propriétés du miel (Postmes *et al.*, 1995 *in* Kwakman *et al.*, 2011).

2.1.2. Utilisation du Revamil® pour les analyses expérimentales

Le miel Revamil® a été acheté sous forme de tubes de 18g et est stocké à température ambiante (TA). Afin de discriminer les effets des sucres présents dans le Revamil® des autres composés spécifiques au miel (et de composition inconnue), une condition contrôle a été établie pour chaque expérience. Cette condition contrôle correspond à une incubation des cellules en présence d'une solution (appelée « Sugar mix » dans ce travail) préparée en respectant une composition en sucres similaire à celle du Revamil® (Tableau 2.1.) (Kwakman *et al.*, 2011). Cette solution est également stockée à TA. Pour les expériences, des solutions diluées de « Sugar mix » ou de Revamil® sont préparées dans du milieu de culture cellulaire, et sont ensuite filtrées pour les rendre stériles à l'aide de filtres Filtropur S 0.2 µm (Sarstedt, Germany). Ces solutions diluées sont stockées à 4°C.

2.2. Culture cellulaire

2.2.1. Lignée cellulaire RAW264.7

La lignée des macrophages RAW264.7 (ATCC, USA) fut établie à partir d'une tumeur induite chez des souris BALB/c par le virus de la leucémie murine d'Abelson (Hartley *et al.*, 2008).

2.2.1.1. Culture et repiquage des macrophages RAW264.7

Les macrophages RAW264.7 sont cultivés dans du milieu de culture DHG-L1 (high glucose (4,5 g/L) Dulbecco's modified Eagle's medium contenant du $NaHCO_3$ (1,5 g/L)) et supplémenté de 10 % de Sérum de veau fœtal Inactivé par la Chaleur (SIC). Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture T75 (75 cm^2) (Corning-Costar, USA), placées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO_2. À confluence (environ 25.10^6 cellules/boîte), les cellules (légèrement adhérentes) sont récoltées délicatement à l'aide d'un grattoir et réensemencées à une dilution 1/10 ou 1/20 dans 20 mL de milieu de culture pour une culture, respectivement de 2 ou 3 jours (voir réactifs et matériels, Tableau 2.2.).

2.2.1.2. Méthode de polarisation des macrophages RAW264.7 en macrophages M1 et M2

Les macrophages RAW264.7 sont polarisés en macrophages M1 en les incubant en présence de milieu DHG-L1 contenant 10 ng/ml de LPS d'*Escherichia coli* (sérotype 0111:B4 – Sigma, USA) et de 20 ng/ml d'IFNγ (R&D Systems, USA) pendant 18 h dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 (Pireaux *et al.*, 2016).

Tableau 2.3. Réactifs et matériels nécessaires au repiquage des cellules THP-1.

Matériel	*THP-1*
Milieu de culture	**RPMI base** - L-glutamine RPMI 1640 (Gibco, USA) - 2,5 g/L glucose (Merck, Germany) - 1 mM sodium pyruvate (Gibco, USA) - 0,05 mM β-mercaptoéthanol (Gibco, USA) - 10 mM HEPES (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco, USA)
Sérum	**10% Sérum Inactivé par la Chaleur (SIC)** Sérum de veau foetal (Gibco, USA) décomplémenté à 56°C durant 30 min
Matériel supplémentaire	- Boîtes de culture T75 (75 cm) (Corning-Costar, USA) - Pipettes stériles (Corning-Costar, USA) - Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, USA) - Bleu de Trypan (ThermoFischer Scientific, USA)

Tableau 2.4. Préparation du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline), pH 7,4.

Composé	*Concentration (mM)*
Tampon PO_4^{3-} - 0,5 M KH_2PO_4 (Merck, Germany) - 0,5 M K_2HPO_4 (Merck, Germany)	10
NaCl (Merck, Germany)	150

Les macrophages RAW264.7 sont polarisés en macrophages M2 en les incubant en présence de milieu DHG-L1 contenant 20 ng/ml d'IL-4 et de 20 ng/ml d'IL-13 (R&D Systems, USA) pendant 18 h dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % CO_2 (Pireaux *et al.*, 2016).

2.2.2. Lignée cellulaire THP-1

La lignée des THP-1 (ATCC, USA) a été établie à partir de sang périphérique d'un être humain souffrant d'une leucémie monocytaire aigüe (Tsuchiya *et al.*, 1980).

2.2.2.1. Culture et repiquage des monocytes THP-1

Les monocytes THP-1 sont des cellules en suspension cultivées dans du milieu RPMI 1640 + L-glutamine supplémenté en glucose (2,5 g/L), pyruvate de sodium (1mM), d'HEPES ((2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (10 mM, pH 7,4), de β-mercaptoéthanol (0,05 mM) et de 10 % de SIC, dans des boîtes de culture T75 (75 cm^2) (Corning-Costar, USA). Les cellules sont placées dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO_2. À confluence, les cellules sont comptées à l'aide d'un Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, USA) et ensemencées à une densité de 3,6 millions de cellules dans 15 mL de milieu de culture ou de 3,0 millions de cellules dans 20 mL de milieu de culture pour, respectivement une culture de deux ou trois jours (voir réactifs et matériels, Tableau 2.3.).

2.2.2.2. Méthode de différenciation et de polarisation des monocytes THP-1

Les monocytes THP-1 sont différenciés en macrophages M0 adhérents suite à une incubation de 24 h dans du milieu RPMI en présence de 150 nM de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (Sigma, USA) dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO_2. Les cellules sont ensuite rincées une fois avec du tampon PBS à 37°C (Tableau 2.4.) et ensuite incubées dans du milieu de culture frais durant 24h. Ensuite, les macrophages THP-1 peuvent être polarisés en macrophages M1 ou M2.

Les macrophages THP-1 (M0) sont polarisés en macrophages M1 en les incubant présence de milieu RPMI contenant 10 pg/ml de LPS d'*Escherichia coli* (sérotype 0111:B4 – Sigma, USA) et de 20 ng/ml d'IFNγ (R&D Systems, USA) pendant 24 h dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % CO_2. Les macrophages THP-1 sont polarisés en macrophages M2 en les incubant présence de milieu RPMI contenant 20 ng/ml d'IL-4 et de 20 ng/ml d'IL-13 (R&D Systems, USA) pendant 24 h dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % CO_2 (Genin *et al.*, 2015).

2.3. Mesure des effets du Revamil® sur le pH et l'osmolarité des milieux de culture

2.3.1. Mesure du pH

Des solutions contenant différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) de « Sugar mix » ou de Revamil® ont été préparées dans du milieu de culture RPMI 1640 sans sérum. Le pH des solutions préparées a ensuite été mesuré à température ambiante avec un pH-mètre analytique standard PHM-210 (Radiometer, Danemark). Du PBS à pH 7,4 a été utilisé comme référence.

2.3.2. Mesure de l'osmolarité

Des solutions contenant différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) de « Sugar mix » ou de Revamil® ont été préparées dans du milieu de culture DHG-L1 supplémenté de 10 % de SIC. L'osmolarité des solutions préparées a ensuite été mesurée avec un Micro-osmomètre calibré Type 6 (Löser, Germany), un équipement disponible en URVI (nous adressons nos plus chaleureux remerciements au Prof. Benoît Muylkens pour nous avoir permis de l'utiliser). Les osmolarités du milieu DHG-L1 sans sérum, d'une solution de NaCl (150 mM) ou de saccharose (250 mM) ont également été mesurée et utilisées comme références.

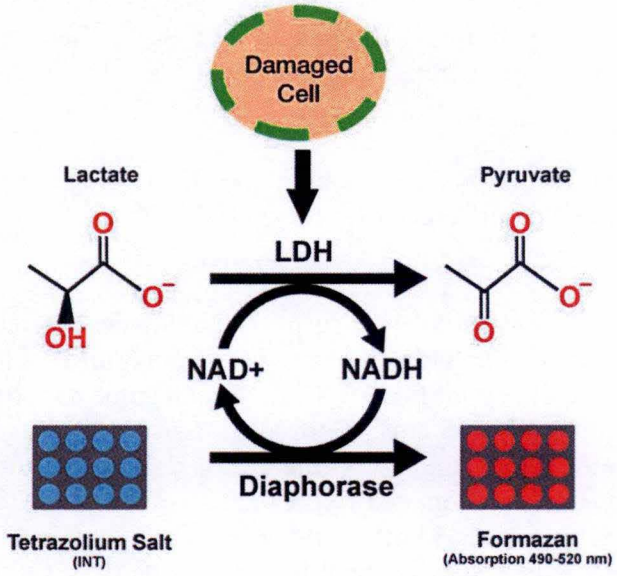


Figure 2.2. Principe du kit de détection de la cytotoxicité basé sur la libération de LDH.

La LDH (lactate déshydrogénase) est une enzyme cytosolique de 140 kDa, éventuellement libérée par les cellules en réponse à un stress cytotoxique qui augmente la perméabilité de la membrane plasmique. Le dosage de l'activité enzymatique libérée dans les milieux de culture conditionnés permet donc de mesurer la cytotoxicité. La réaction d'oxydo-réduction qui est suivie repose sur l'oxydation du lactate en pyruvate en présence de NAD^+ qui est réduit en NADH + H^+. Le NADH est ensuite utilisé comme un cofacteur pour la diaphorase qui catalyse la réduction des sels de tetrazolium (jaune pâle) en sels de formazan (rouge). L'activité de la LDH est déterminée par la mesure de l'absorbance du formazan produit au cours de cette réaction.
(CEPHAM – Life Sciences, Inc. – LDH Cytotoxicity assay).

Tableau 2.5. Réactifs et matériels nécessaires pour le test de cytotoxicité - LDH

Format de culture	Plaques 24-puits (2 cm /puit) (Corning-Costar, USA)
Cellules	- RAW264.7 : 25 000 cellules/puit - THP-1 : 80 000 cellules/puit
Solutions	- PBS non stérile (voir Tableau 2.4.) - Triton-X-100 (Sigma, USA) - PBS + Triton X-100 (2%)
Kit de détection de cytotoxicité (Roche, Switzerland) (stocké à -20°C)	- Solution 1 : chlorure d'iodonitrotetrazolium + sodium lactate (reconstituée avec 1 ml d'eau distillée et placée à 4°C) - Solution 2 : diaphorase + NAD^+ (dégelée et placée à 4°C)
Matériel supplémentaire	- Microtubes (Eppendorf, Germany) - Centrifugeuse 4°C (ThermoFischer Scientific, USA) - Microplaque 96-puits (Greiner Bio-One, Germany) - xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer (BioRad, USA) - Logiciel MPM6 (Microplate manager 6)

2.4. Test de cytotoxicité – test LDH

2.4.1. Principe du kit de détection de cytotoxicité (LDH)

Le kit de détection de cytotoxicité (LDH) (Roche, Switzerland) a été utilisé pour évaluer la toxicité potentielle de différentes concentrations de « Sugar mix » et Revamil® afin de sélectionner la concentration la plus forte n'altérant pas (ou peu) la viabilité cellulaire. Le test a pour but de doser l'activité de la LDH, une enzyme cytosolique, libérée dans le milieu extracellulaire suite à l'augmentation de la perméabilité membranaire des cellules résultant d'un stress cytotoxique. Considérant un tel stress, trois compartiments doivent être pris en compte : les cellules adhérentes, les cellules détachées et corps apoptotiques, et le surnageant. Le dosage de l'activité enzymatique de la LDH est mesuré dans ces trois compartiments et ce, pour chaque condition expérimentale.

Le dosage repose sur une réaction colorimétrique (Figure 2.2.). Le kit fournit deux solutions à reconstituer pour former un mélange réactionnel composé de lactate, de NAD^+, de sels de tetrazolium et de la diaphorase, une enzyme qui réduit les sels de tetrazolium (jaune pâle) en sels de formazan (rouge) en présence de $NADH + H^+$. Ainsi, en cas de cytotoxicité, la LDH présente oxyde le lactate en pyruvate, catalysant la réduction du NAD^+ en $NADH + H^+$, ce qui permet la formation de formazan. Son absorbance est alors mesurée au spectrophotomètre à 490 nm (référence à 655 nm).

2.4.2. Méthode

Les macrophages RAW264.7 et les monocytes THP-1 ont été ensemencés dans des boîtes de culture 24-puits à raison de, respectivement, 25 000 cellules et 80 000 cellules par puits, puis incubées dans 0,5 mL de milieux RPMI contenant différentes concentrations croissantes de « Sugar mix » ou de Revamil® (1, 2, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) pendant 24, 48 et 72 h. Les milieux de culture ont été renouvelés toutes les 24 h et la cytotoxicité a été évaluée durant les dernières 24 h de chaque temps d'incubation. Un contrôle positif constitué de 0,5 mL de PBS-Triton-X-100 (2 %) a également été réalisé afin de mesurer l'activité maximale de LDH associée au tapis cellulaire susceptible d'être libérée par des cellules « naïves » non traitées.

Au terme des incubations, le milieu de culture (0,5 mL) est transféré dans des microtubes annotés « D » (cellules détachées) et placés sur glace. Un lysat cellulaire est réalisé en ajoutant un volume de 250 µl de PBS-Triton-X-100 (2 %) aux cellules adhérentes au puits. Après 10 min sur glace, les lysats sont transférés dans des microtubes annotés « L » (lysats) et placés sur glace. Entre-temps, les microtubes « D » sont centrifugés pendant 5 min à 2000 rpm (à 4°C). Les surnageants obtenus sont alors transférés dans des microtubes annotés « S » (surnageants) et placés sur glace. Les culots des microtubes « D » sont ensuite resuspendus dans 250 µl de PBS-Triton-X-100 (2%) et placés sur glace pendant 10 min. De chacune de ces fractions L, S (diluées 2x) et D (diluées 20x), un volume de 100 µl est transféré dans les puits d'une microplaque à 96-puits. Des puits sont également prévus pour le blanc « surnageant » (bS : 100 µl milieu de culture) et les blancs « cellules détachées » et « lysats » (bD et bL : 100 µl de PBS-Triton-X-100 (2%)). Ensuite, un volume de 100 µl de réactifs (préparé à partir de 222 µl de solution 1 et 10 ml de solution 2) est ajouté à chaque échantillon. L'absorbance des produits de réaction est mesurée au spectrophotomètre à 495 nm (référence à 655 nm) (voir réactifs et matériels, Tableau 2.5.).

Enfin, les pourcentages de libération de la LDH sont calculés selon la formule :

$$\textbf{\textit{Relargage LDH}}\ (\%) = \mathbf{100}\,.\ \frac{\big((S - bS) * 2\big) + (D - bD)}{((S - bS) * 2) + (D - bD) + ((L - bL) * 20)}$$

Tableau 2.6. Réactifs et matériels nécessaires pour le dosage de protéines par la méthode de Folin.

Format de culture	Plaques 6-puits (10 cm /puit) (Corning-Costar, USA)
Cellules	RAW264.7 : 150 000 cellules/puit
Solutions	- Eau distillée - PBS non stérile (voir tableau 2.4.) - BSA (400 µg/ml) (ThermoFischer Scientific, USA) - Solution A : → *Na_2CO_3 (2%) (Merck, Germany)* → *1% de tartrate de Na et K (2%) (Merck, Germany)* → *1% de $CuSO_4$ (1%) (UCB, Belgium)* - Réactif de Folin-Ciocalteu's Phenol (Merck, Germany)
Matériel supplémentaire	- Microtubes (Eppendorf, Germany) - Thermomixer Comfort (Eppendorf, Germany) - Microplaque 96-puits (Greiner Bio-One, Germany) - xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer (BioRad, USA) - Logiciel MPM6 (Microplate manager 6)

2.5. Tests de prolifération cellulaire

2.5.1. Détermination de la concentration en protéines – Méthode de Folin

2.5.1.1. Principe

Le dosage de protéines par la méthode du Folin se base sur une réaction colorimétrique. En milieu alcalin, le réactif de Folin (un complexe phospho-molybdique/phospho-tungstique) est réduit par le noyau phénolique des résidus tyrosine donnant une coloration bleue à la solution. Afin de rendre cette réaction plus sensible et de favoriser le transfert d'électrons, une solution composée de sulfate de cuivre ($CuSO_4$) est préalablement ajoutée aux échantillons protéiques (Lowry *et al.*, 1951).

Des dosages protéiques de ce type ont été réalisés pour estimer la prolifération des macrophages RAW264.7.

2.5.1.2. Méthode

Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des plaques 6-puits à raison de 150 000 cellules par puit, et traitées avec des concentrations croissantes de « Sugar mix » ou Revamil® (1, 6, 8, 10 et 40 mg/ml de milieu de culture) pendant 24, 48 et 72 heures. Les milieux de culture ont été renouvelés toutes les 24 heures.

Au terme des incubations, les cellules sont rincées une fois avec X mL de PBS (4°C), puis hydrolysées avec 200 µl de de NaOH (0,5 M). Les hydrolysats cellulaires sont ensuite transférés dans des microtubes et placés sur un agitateur durant 30 min à TA. Pour le dosage protéique, une courbe de calibration standard (CCS) est réalisée à l'aide de différentes concentrations d'albumine sérique bovine (ASB) allant de 0 à 400 µg/ml. Un volume de 30 µl de chaque échantillon est transféré dans les puits d'une microplaque 96-puits. Un volume de 150 µl d'une solution A composée de Na_2CO_3 (2 %) contenant 1 % de tartrate de sodium et potassium et 1 % de $CuSO_4$ est ensuite ajouté à chaque échantillon. La plaque est alors placée sur un agitateur (500 rpm) pendant 30 min à TA. La réaction est alors débutée par l'ajout d'un volume de 15 µl de réactif de Folin-Ciocalteu's Phenol dilué deux fois dans de l'eau distillée pour une nouvelle incubation à TA de 30 min (sur un agitateur (900 rpm)). L'absorbance des échantillons est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 740 nm (voir réactifs et matériels, Tableau 2.6.).

Enfin, la concentration en protéines est calculée selon la formule :

$$\boldsymbol{Concentration\ (\mu g/ml)} = \frac{(\boldsymbol{absorbance - intersection_{CCS}})}{\boldsymbol{pente_{CCS}}}$$

2.5.2. Comptage cellulaire

Comme les monocytes THP-1 sont cultivés en suspension, la prolifération de ces cellules a été mesurée par des comptages cellulaires.

Les monocytes THP-1 ont été ensemencés dans des boîtes de culture T25 (25 cm^2) (Corning-Costar, USA) à raison de 880 000 cellules par T25 et incubées dans du milieu de culture contenant des concentrations croissantes de « Sugar mix » ou de Revamil® (1, 4, 8 et 10 mg/ml de milieu de culture) durant 24, 48 et 72 h. Au terme des incubation, les cellules sont comptées avec un Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, USA).

Tableau 2.7. Réactifs et matériels nécessaires pour la RT-qPCR.

Format de culture	Plaques 6-puits (10 cm /puit) (Corning-Costar, USA)
Cellules	RAW264.7 : 750 000 cellules/puit
Extraction d'ARN	- RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen, Germany) → *Buffer RLT, RPE, RWI* → *Colonnes de purification (RNeasy Mini spin columns)* → *Microtubes « safe-lock » RNase-free (1,5 et 2 ml)* - Ethanol 70% (Merck, Germany) - Eau et Tips RNase-free - Grattoirs – 24 cm (TPP, Switzerland) - Paillasse RNase-free - SDS 1% (Carl Roth, Belgique)
Rétro-transcription	- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Switzerland) → *Amorces oligo-dT* → *Reverse Transcriptase (1)* → *Buffer RT 5x (2)* → *Protector RNase Inhibitor (3)* → *dNTP mix (4)* ⇨ Mixture réactionnnelle (7µl) = 4 µl (2) + 2 µl (4) + 0,5 µl (1) + 0,5 µl (3) - Eau RNase-free - Trois blocs chauffants (65°C, 55°C et 85°C)
RT-qPCR	- Amorces « forward » et « reverse » (voir Tableau 2.7.) (IDT, USA) - SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, USA) - Eau et Tips RNase-free - Microplaque optique 96-puits (Applied Biosystems, USA) - Centrifugeuse Centra CL3R (Thermo IEC, USA) - ViiA7 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)

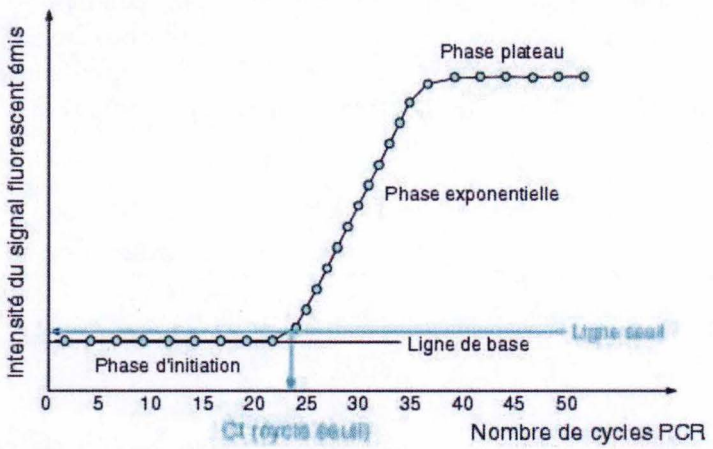


Figure 2.3. Courbe d'amplification obtenue par RT-qPCR.

La quantité d'ADNc introduite au départ de la réaction d'amplification (traduite par l'intensité du signal fluorescent de la sonde fluorescente constituée d'une molécule s'intercalant entre les bases de l'ADN) est suivie en temps-réel. Elle évolue en deux phases au cours du nombre de cycles d'amplification PCR : une première phase exponentielle (excès d'amorces présentes au départ), suivie d'une seconde phase « plateau » (compétition entre dénaturation et hybridation des amorces). La quantification de l'ADNc initiale est réalisée dans la partie linéaire de la phase exponentielle, où est établie une valeur seuil correspondant au bruit de fond (ligne de base). Le nombre d'amplifications nécessaires pour détecter l'amplicon d'intérêt correspond à la valeur pour laquelle le signal de fluorescence dépasse le seuil prédéfini. Cette valeur est appelée le « *cycle threshold* », noté Ct. La valeur du Ct est donc inversément proportionnelle à la quantité initiale d'ADNc (et donc de l'abondance de l'ARNm rétro-transcrit en ADNc dans l'échantillon).
(Tse et Capeau, 2003)

2.6. Analyse d'expression de gènes au niveau du transcrit – RT-qPCR

2.6.1. Extraction et purification d'ARN total

Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des plaques 6-puits à raison de 750 000 cellules par puits, et polarisés en macrophages M1 ou M2 (voir point 2.2.1.2.) en présence de concentrations croissantes de « Sugar mix » ou de Revamil® (1, 4 et 10 mg/ml de milieu de culture) pendant 18 h. Une fois la polarisation terminée, l'ARN total est extrait à l'aide du kit d'extraction « RNeasy Mini Kit (50) » (Qiagen, Germany) dans un environnement RNase-free (SDS 1%). Les cellules sont lysées dans 350 µl de tampon de lyse RLT du kit. Les lysats cellulaires sont ensuite transférés dans des microtubes « safe-lock » de 2 mL. La purification d'ARN messager est enfin réalisée avec le robot QIAcube (Qiagen, Germany), dans des conditions « DNase digest », suivant le protocole ID3368 décrit dans le kit RNeasy Mini (50) de la firme. Après purification, l'ARN des échantillons est quantifié par une mesure de l'absorbance à 260 nm au spectrophotomètre NanoDrop-1000 (ThermoFischer Scientific, USA). Les échantillons d'ARN sont enfin stockés à -70 °C avant l'étape de rétro-transcription (voir réactifs et matériels, Tableau 2.7.).

2.6.2. Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

2.6.2.1. Principe

L'analyse de l'expression de gènes marqueurs de la polarisation de macrophages M1 ou M2 dans dans des cellules exposées au « Sugar mix » ou au Revamil® a été réalisée en RT-qPCR (ou rétro-transcription et PCR quantitative). Cette méthode est dite « en temps réel » car l'amplification des gènes d'intérêt est suivie tout au long de la réaction. Cette réaction d'amplification est constituée de deux étapes : une première phase exponentielle (excès d'amorces présentes au départ), suivie d'une seconde phase « plateau » (compétition entre dénaturation et hybridation des amorces) (Figure 2.3.).

La quantification de l'expression des gènes d'intérêt (à savoir la quantité d'ADNc introduite au départ) est réalisée grâce à une molécule fluorescente qui s'intercale entre les bases des acides nucléiques doubles brins (SYBR® Green) permettant d'évaluer la quantité d'amplicons obtenue par PCR. Cette quantification a lieu au niveau de la partie linéaire de la phase exponentielle, où est établie une valeur de seuil théorique correspondant au bruit de fond. Le nombre d'amplifications nécessaires pour détecter l'amplicon d'intérêt correspond à la valeur où le signal de fluorescence dépasse le seuil prédéfini. Cette valeur est appelée le « *cycle threshold* », noté Ct. Cette valeur est donc inversément proportionnelle à la quantité d'ADNc de départ (et donc de l'abondance du transcrit correspondant au gène d'intérêt). La valeur de Ct du gène d'intérêt doit être normalisée à la valeur de Ct d'un gène dont l'expression reste inchangée suite aux conditions de traitement des cellules (appelé gène de référence, gène de maintenance ou « *house-keeping gene* » (HKG)).

2.6.2.2. Étape de rétro-transcription

La rétro-transcription des échantillons d'ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée avec le « Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit » (ROCHE, Suisse) selon le protocole recommandé par la firme. Une quantité totale correspondant à 2 µg d'ARNm est préparée dans de l'eau RNase-free dont le volume final est porté à 12 µl, auquel est ajouté 1 µl d'oligo-dT. Les échantillons sont ainsi incubés à 65°C durant 10 min. Ensuite, un volume de 7 µl de mixture réactionnelle (voir Tableau 2.7.) est ajouté à chaque échantillon. Ces derniers sont incubés à 55°C pendant 30 min afin de permettre la synthèse d'ADNc, puis à 85°C durant 5 min afin d'inhiber la réaction de rétro-transcription. Les échantillons d'ADNc sont enfin stockés à -20°C avant PCR quantitative (voir réactifs et matériels, Tableau 2.7.).

Tableau 2.8. Amorces des gènes d'intérêt utilisés en RT-qPCR.

Gène (concentration stock)	*Séquence de l'amorce "forward"*	*Séquence de l'amorce "reverse"*	*Dilution d'ADNc*
GAPDH (27 µM)	5'-TGAGCAAGAGAGGCCCTAT-3'	5'-AGGCCCCTCCTGTTATTATG-3'	1 : 100
RPL13 (27 µM)	5'-GAGGTCGGGTGGAAGTACCA-3'	5'-TGCATCTTGGCCTTTTCCTT-3'	1 : 100
iNOS (9 µM)	5'-CAATGGCAACATCAGGTCGG-3'	5'-CGTACCGGATGAGCTGTGAA-3'	1 : 10
IL-6 (9 µM)	5'-CTCTGCAAGAGACTTCCATCC-3'	5'-TGAAGTCTCCTCTCCGGACT-3'	1 : 10
MRC1 (9 µM)	5'-GGATTGCCCTGAACAGCAAC-3'	5'-ACTTAAGCTTCGGCTCGTCA-3'	1 : 100
Arg 1 (9 µM)	5'-GTACATTGGCTTGCGAGACG-3'	5'-TTTCTTCCTTCCCAGCAGGT-3'	1 : 10

Tableau 2.9. Traitements cellulaires et gènes cibles testées pour l'analyse par western-blot

Conditions de stimulation	*Concentrations*	*Temps d'incubation*	*Type de lyse*	*Cibles testées*
« Sugar mix » Revamil®	1, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml	1h30 et 24h	« HIF »	p38 et p-p38
« Sugar mix » Revamil®	8 mg/ml	48h	« RIPA »	LAMP-1 TOM20 VDAC LC3-II p62
		2h, 12h et 24h	« RIPA »	LAMP-1 PGC-1α
		2h et 12h	« HIF »	mTOR et p-mTOR S6K et p-S6K

Condition 1 : Les cellules sont incubées dans du milieu de culture contenant des concentrations croissantes de « Sugar mix » ou de Revamil® (1, 4 ,6, 8, 10 et 40 mg/ml de milieu de culture) durant 1h30 ou 24 h. L'objectif est de tester le potentiel effet de ces solutions sur l'induction éventuelle d'un stress hyperosmotique au niveau cellulaire. Les résultats de ces expériences permettront de sélectionner la concentration la plus élevée ne provoquant pas de stress hyperosmotique pour les cellules. Le marqueur protéique testé est l'activation de la MAPK p38 détectée par la phosphorylation des résidus d'acides aminé Thr180 etTyr82.

Condition 2a : Les cellules sont incubées dans du milieu de culture contenant du « Sugar mix » ou du Revamil® (8 mg/ml de milieu de culture) pendant 48 h. L'objectif est de tester l'effet potentiel du Revamil® sur l'abondance des mitochondries, des lysosomes ou de marqueurs autophagiques. Les marqueurs protéiques testés sont LAMP-1 pour les lysosomes, TOM20 et VDAC pour les mitochondries et LC3-II et p62 pour la réponse autophagique.

Condition 2b et 2c : Les cellules sont incubées dans du milieu de culture contenant du « Sugar mix » ou du Revamil® (8 mg/ml de milieu de culture) durant 2, 12 et 24 h. L'objectif est de tester (en cinétique) l'effet modulateur éventuel du Revamil® sur l'abondance des lysosomes. Le marqueur protéique testé est LAMP-1. Parallèlement, sont testés des marqueurs protéiques de la régulation de la biogenèse mitochondriale (PGC1α) et des fonctions lysosomales (activation par phosphorylation de mTOR (Ser2448) et suivi de l'activation d'une cible de mTOR: la phosphorylation de S6K (Thr389)).

Remarque : La lyse cellulaire de type « HIF » est utilisée pour obtenir des lysats contenant des protéines cytosoliques. La lyse cellulaire de type « RIPA » (avec sonication) permet d'obtenir des lysats contenant des protéines ancrées en membrane, en plus des protéines cytoplasmiques.

Tableau 2.10. Réactifs et matériels nécessaires pour la préparation des lysats cellulaires.

Format de culture	Boîtes de culture T25 (25 cm) (Corning-Costar, USA)
Densité cellulaire	RAW264.7 : 2.10^6 cellules/T25 THP-1 : 2.10^6 cellules/T25
Solutions	- PBS non stérile (voir tableau 2.4.) - PIC stock (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche, Switzerland) → *1 tablette « PIC » dissoute dans 2 ml d'eau distillée* - PIB stock (Phosphatase Inhibitor Buffer) → *25 mM Na_3VO_4 (Sigma, USA)* → *125 mM NaF (Merck, Germany)* → *250 mM β-glycérophosphate (VWR, Belgique)* → *250 mM PNPP (Sigma, USA)* - Tampon de lyse « HIF » 2X → *80 mM Tris, pH 7,4 (Carl Roth, Belgique)* → *300 mM KCl (Merck, Germany)* → *2 mM EDTA (Merck, Germany)* - Tampon de lyse « RIPA » → *25 mM Tris-HCL, pH 7,6(Carl Roth, Belgique)* → *150 mM NaCl (Merck, Germany)* → *1% NP40 (Merck, Germany)* → *1% Sodium deoxylate (Merck, Germany)* → *0,1% SDS (Merck, Germany)*
Tampon de lyse « HIF » complet (%/volume)	- 50 % Tampon de lyse « HIF » 2X - 1 % Triton-X-100 (Merck, Germany) - 4 % PIC - 4 % PIB - 41 % eau distillée
Tampon de lyse « RIPA » complet (%/volume)	- 91 % Tampon de lyse « RIPA » - 4,5 % PIC - 4,5 % PIB
Matériel supplémentaire	- Microtubes (Eppendorf, Germany) - Grattoirs – 24 cm (TPP, Switzerland) - Centrifugeuse 4°C (ThermoFischer Scientific, USA) - Sonicateur – Cycle 1 / Amplitude 50 (Hielscher, Germany)

Tableau 2.11. Réactifs et matériels nécessaires pour le dosage protéique par la méthode Pierce 660.

Solutions	- Eau distillée - ASB (1 µg/µl) (ThermoFischer Scientific, USA) - Pierce 660 Assay Reagent (ThermoFischer Scientific, USA)
Matériel supplémentaire	- Microtubes (Eppendorf, Germany) - Microplaque 96-puits (Greiner Bio-One, Germany) - xMark Microplate Absorbance Spectrophotometer (BioRad, USA) - Logiciel MPM6 (Microplate manager 6)

2.6.2.3. Méthode de PCR quantitative en temps-réel (qPCR)

L'amplification par qPCR des gènes d'intérêt est réalisée dans des microplaques 96-puits. Les amorces « forward » et « reverse » de chaque gène testé (voir Tableau 2.8.) sont diluées à une concentration finale de 3 µM dans de l'eau RNase-free. Chaque puit contient 12,5 µl de SYBR® Select Master Mix, 2,5 µl d'amorce « forward », 2,5 µl d'amorce « reverse », 2,5 µl d'eau RNase-free et 5 µl d'échantillons d'ADNc dilués 10 fois ou 100 fois dans de l'eau RNase-free en fonction du gène testé (Tableau 2.8.). La plaque est ensuite scellée et centrifugée à 1200 rpm durant 1 minute. Le processus d'amplification est pris en charge par le système « *ViiA7 real-time PCR* » (Applied Biosystems, USA) et consiste en 40 cycles d'amplification. Chaque cycle est constitué de 15 minutes de dénaturation des brins d'ADNc à 95°C, suivies de 1 minute d'hybridation des amorces et élongation des brins par la polymérase à 65°C (voir réactifs et matériels, Tableau 2.7.).

Le gène codant pour la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est utilisé comme gène de référence pour comparer les programmes de polarisation de macrophages, tandis que le gène codant pour la protéine ribosomale L13 (RPL13 – 23 kDa) est utilisé pour normaliser l'expression des gènes d'intérêt dans les macrophages M0, M1 et M2 incubés en présence de « Sugar mix » ou de Revamil®). Le niveau d'expression du gène d'intérêt des cellules exposées aux traitements (par rapport à une condition contrôle) est calculé selon la formule :

$$\boldsymbol{Niveau\ d'induction} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Où : ΔCt = Ct du gène d'intérêt – Ct de l'HKG (pour une même condition)
ΔΔCt = ΔCt d'une condition traitée – ΔCt d'une condition contrôle (pour un même gène d'intérêt)

2.7. Analyse d'expression de gènes au niveau protéique – Western-blot

2.7.1. Préparation de lysats cellulaires

Pour ces analyses, différents traitements cellulaires ont été réalisés (voir Tableau 2.9.). Suite à l'incubation de macrophages RAW264.7 avec des concentrations croissantes de « Sugar mix » ou de Revamil® (1, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml de milieu de culture) durant 1h30 et 24 h, ou avec une concentration de 8 mg/ml de « Sugar Mix » et de Revamil® pendant une cinétique de 2, 12, 24 et 48h, les cellules sont placées sur glace et rincées une fois avec 5 mL PBS (4°C) pendant 5 min. Les cellules sont ensuite lysées dans 150 µl de tampon de lyse de type « HIF » ou « RIPA » (voir compositions Tableau 2.10.) pendant 5 min. Les lysats sont récoltés à l'aide d'un grattoir puis transférés dans des microtubes. Dans le cas de la lyse « RIPA », les échantillons sont soumis à 3 sonications de 10 s. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C. Les lysats cellulaires sont ensuite transférés dans de nouveaux microtubes. Les protéines sont ensuite dosées par la méthode de Pierce 660. Les lysats sont enfin stockés à -70°C (voir réactifs et matériels, Tableau 2.10.).

2.7.2. Dosage protéique – Méthode de Pierce 660

Pour le dosage protéique, une courbe de calibration standard (CCS) est réalisée à l'aide de différentes concentrations d'ASB (allant de 0 à 10 µg/µl). Pour chaque condition, un volume de 2 µl d'échantillon (expliquant le facteur 1/2 de la formule) dans un volume de 8 µl d'eau distillée est transféré dans les puits d'une microplaque 96-puits. Un volume de 150 µl de réactif de Pierce 660 est ensuite ajouté à chaque échantillon pour une réaction de 5 min à TA. L'absorbance du produit de réaction est mesurée au spectrophotomètre à 660 nm (voir réactifs et matériels, Tableau 2.11.). Enfin, la concentration en protéines est calculée par la formule suivante :

$$\boldsymbol{Concentration}\left(\frac{\mu g}{\mu l}\right) = \frac{1}{2} * \left(\frac{absorbance - intersection_{CCS}}{pente_{CCS}}\right)$$

Tableau 2.12. Réactifs et matériels nécessaires pour la migration de protéines par électrophorèse.

Matériel	*« Gels maison » SDS-PAGE*	*Gels précoulés « NuPAGE™ »*
Bleu de charge	**Bleu de charge 5X** - 143 mM Tris-HCl (Carl Roth, Belgique) - 200 mM SDS (Carl Roth, Belgique) - 2 M β-mercaptoéthanol (Gibco, USA) - 25% Glycérol (Merck, Germany) - 0,75 mM Bleu de bromophenol (Janssen, Belgique) - pH 8,0	**Bleu de charge 4X** **NuPAGE™ LDS Sample Buffer** (ThermoFischer Scientific, USA) + 2% DTT (1M) (Sigma, USA)
Gel	**SDS-PAGE (12%)** (Composition : Tableau 2.13.)	**NuPAGE™** **(gradient 3-8% ou 4-12%)** (ThermoFischer Scientific, USA)
Tampon d'électrophorèse	- 2,5 mM Tris-HCl (Carl Roth, Belgique) - 19,2 mM Glycine (Merck, Germany) - 0,01 % SDS (Carl Roth, Belgique) - pH 8,5	- 5% NuPAGE™ Tris-Acétate - 0,01% NuPAGE™ antioxidant
Matériel supplémentaire	- Marqueur de poids moléculaire → *Color Protein Standard Broad Range* (BioLabs, USA) → *HiMark Pre-stained HMW Protein Standard* (Invitrogen, USA) - Microtubes (Eppendorf, Germany) - Tips long - Eau distillée - Bloc chauffant - Centrifugeuse MiniSpin (Eppendorf, Germany) - Cuve d'électrophorèse NuPAGE™ (ThermoFischer Scientific, USA) - Générateur pour électrophorèse (Pharmacia Biotech, USA)	

Tableau 2.13. Composition et préparation des « gels maison » SDS-PAGE (12% acrylamide).

Composant	*Gel de séparation* *(préparer 5 ml pour 1 gel)*	*Gel de concentration* *(préparer 4 ml pour 1 gel)*
Tampon de séparation (pH 8,8) - 1,5 M Tris (Carl Roth, Belgique) - 0,4% SDS (Carl Roth, Belgique)	**1,2 ml**	-
Tampon de concentration (pH 6,8) - 0,5 M Tris (Carl Roth, Belgique) - 0,4% SDS (Carl Roth, Belgique)	-	**1,25 ml**
Eau distillée	**1,8 ml**	**2,25 ml**
Acrylamide/bis (30/0,8%) (PlusONE, Belgique)	**2,8 ml**	**0,5 ml**
APS 10% (PlusONE, Belgique)	**25 µl**	**50 µl**
TEMED (PlusONE, Belgique)	**5 µl**	**5 µl**
Polymérisation	Verser la préparation entre deux plaques de verre (BioRad, USA), recouvrir le gel avec du SDS 0,1% et laisser polymériser pendant 40 min	Verser sur le gel de séparation et laisser polymériser durant 30 minutes avec un peigne 10- ou 15-puits

2.7.3. Western-blot en fluorescence

2.7.3.1. Principe

La méthode du western-blot permet d'évaluer l'abondance d'une protéine ou de sa forme modifiée (phosphorylée, clivée, etc) dans un échantillon à partir de de lysats cellulaires. Pour l'analyse, les protéines sont tout d'abord séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane où la protéine d'intérêt est marquée à l'aide d'un anticorps « primaire ». Ce dernier est reconnu par un anticorps « secondaire » couplé à un fluorochrome permettant la révélation des protéines d'intérêt suite à l'excitation du fluorophore. Le signal de fluorescence réémis peut ainsi être quantifié en le normalisant au signal de fluorescence résultant de l'immuno-détection d'une protéine choisie comme contrôle de charge. Cette technique permet donc de comparer des abondances protéiques relatives entre échantillons (Delaive *et al.*, 2008).

2.7.3.2. Migration des protéines par électrophorèse

2.7.3.2.1. Méthode pour les gels SDS-PAGE « fait-maison »

Ce type de gel a été choisi pour la résolution électrophorétique de protéines de poids moléculaire moyen (de 40 à 150 kDa). Pour chaque condition, un volume correspondant à 15 µg de protéines sont diluées dans de l'eau distillée et du bleu de charge 5X pour obtenir un volume final de 15 µl (pour gels 15-puits) ou 25 µl (pour gels 10-puits). Les échantillons préparés sont chauffés à 100°C pendant 5 min, puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 2 min. Les échantillons sont ensuite chargés dans les puits d'un gel SDS-PAGE (voir composition et préparation, Tableau 2.13.) placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse. Un puits est conservé pour y charger 2 µl du marqueur de poids moléculaire « Color Protein Standard Broad Range ». L'électrophorèse est réalisée à 200 V durant 40 minutes (voir réactifs et matériels, Tableau 2.12. et 2.13.).

2.7.3.2.2. Méthode pour les gels « NuPAGE™ »

Ce type de gel a été choisi pour la migration de protéines de haut-poids moléculaire (plus de 200 kDa), ainsi que des protéines LC3 et p62. Pour chaque condition, un volume correspondant à 15 µg de protéines est dilué dans de l'eau distillée et du bleu de charge 4X (NuPAGE™ LDS Sample Buffer) pour obtenir un volume final de 15 µl. Les échantillons préparés sont chauffés à 70°C durant 10 minutes, puis centrifugés à 13 000 rpm durant 2 minutes. Les échantillons sont ensuite chargés dans les puits d'un gel 15-puits de type « NuPAGE™ » (gradient 3-8% ou 4-12% d'acrylamide) placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse. Un puit est conservé pour y charger 3 µl du marqueur de poids moléculaire « HiMark Pre-stained HMW Protein Standard ». L'électrophorèse est réalisée à 200 V (voir réactifs et matériels, Tableau 2.12.).

2.7.3.3. Transfert des protéines sur membrane

2.7.3.3.1. Méthode de transfert semi-sec des protéines

Une membrane de transfert Immobilon® en PVDF (« *polyvinylidène difluoride* ») (0,45 µm) est rincée pendant 1 min dans du méthanol (100%) puis 5 min dans le tampon de transfert. Des papiers Whatman et des éponges sont également incubées dans le tampon de transfert. L'assemblage de transfert est ensuite réalisé dans un « blotter » (de bas en haut : éponge, papier whatman, membrane, gel, papier Whatman, éponge). L'électro-transfert semi-sec des protéines du gel sur membrane est réalisé à 1 mA/cm² pendant 2 heures (voir réactifs et matériels, Tableau 2.14.).

Tableau 2.14. Réactifs et matériels nécessaires pour le transfert de protéines sur membrane

<table>
<tr><th>Matériel</th><th>Transfert semi-sec</th><th>Transfert rapide Trans-Blot® Turbo™</th></tr>
<tr><td>Tampon de transfert pour gels « fait-maison »</td><td>- 25 mM Bicine (Sigma, USA)
- 25 mM Bis-Tris (Sigma, USA)
- 1,25 mM EDTA (Sigma, USA)
- 0,05 mM 4-chloro-1-butanol (Sigma, USA)
- 10% methanol (Merck, Gemany)
- 0,1% antioxidant NuPAGE™
- pH = 7,4</td><td rowspan="2">- 5% Trans-Blot® Turbo™ Buffer (BioRad, USA)
- 10% éthanol</td></tr>
<tr><td>Tampon de transfert pour gels « NuPAGE »</td><td>- 5% NuPAGE™ Transfer Buffer
- 10% methanol (Merck, Germany)
- 0,1% antioxidant NuPAGE™</td></tr>
<tr><td>Membrane</td><td colspan="2">Immobilon® PVDF 0,45 µm (Merck, Germany)
Trans-Blot® Turbo™ PVDF 0,45 µm (BioRad, USA)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Matériel supplémentaire</td><td>- Papier whatman
- Éponges
- Feuille de plastique</td><td>Trans-Blot® Turbo™ Transfer Stacks (BioRad, USA)</td></tr>
<tr><td colspan="2">- Méthanol (100%) (Merck, Germany)
- Rouleau (BioRad, USA)</td></tr>
</table>

Tableau 2.15. Réactifs et matériels nécessaires pour le marquage en immunofluorescence des protéines sur membrane.

Solutions	- PBS non stérile (voir tableau 2.3.) - Tween-20 (BioRad, USA) - PBS-Tween-20 (1%) - Odyssey Blocking Buffer (Licor, USA)
Anticorps	Voir Tableau 2.16.
Solution bloquante	- 50 % Odyssey Blocking Buffer + 50% PBS
Matériel supplémentaire	- Boîtes noires d'incubation pour Western-blot (Licor, USA) - Balanceur Rocker/Shaker MR12 (Biosan, France) - Odyssey Scanner (ODY-1896) (Licor, USA) - Logiciel Odyssey (Licor, USA)

Tableau 2.16. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunodétection des protéines en western-blot.

Anticorps	*Nature et Origine*	*Référence*	*Dilution*	*PM (kDa)*
p38	IgG Lapin	#9212 (CST, USA)	1 : 1000	43
p-p38 (Thr180/Tyr182)	IgG Lapin	#9215 (CST, USA)	1 : 1000	43
mTOR	IgG Lapin	#2972 (CST, USA)	1 : 1000	289
p-mTOR (Ser2448)	IgG Lapin	#2971 (CST, USA)	1 : 1000	289
S6K	IgG Lapin	#9202 (CST, USA)	1 : 1000	80
p-S6K (Thr389)	IgG Lapin	#9205 (CST, USA)	1 : 1000	80
LAMP1	IgG Rat	1D4B (DSHB, USA)	1 : 1000	110
TOM20	IgG Lapin	FL-145 (Santa Cruz, USA)	1 : 1000	20
VDAC	IgG Lapin	#4661 (CST, USA)	1 : 1000	32
PGC1α	IgG Lapin	#2178 (CST, USA)	1 : 1000	130
LC3 (I et II)	IgG Souris	#0231-100 (Nanotools, Germany)	1 : 1000	16 - 18
p62 – SQSTM1	IgG Souris	#H00008878-M03 (Abnova, USA)	1 : 1000	62
α-tubuline	IgG Souris	#T5168 (Sigma, USA)	1 : 10 000	55
β-actine	IgG Souris	#A5441 (Sigma, USA)	1 : 20 000	45
Ir-Dye 800 nm (vert)	IgG Chèvre /Anti-lapin	#926-32211 (Licor, USA)	1 : 10 000	-
Ir-Dye 800 nm (vert)	IgG Chèvre / Anti-rat	#926-32219 (Licor, USA)	1 : 10 000	-
Ir-Dye 680 nm (rouge)	IgG Chèvre / Anti-souris	#926-68070 (Licor, USA)	1 : 10 000	-

Les dilutions utilisées et les poids moléculaires (PM) des protéines d'intérêt sont mentionnés en colonnes 3 et 4.

2.7.3.3.2. Méthode de transfert rapide avec le Trans-Blot® Turbo™

Une membrane de transfert Trans-Blot® Turbo™ en PVDF (0,45 µm) est rincée durant 1 min dans du méthanol (100 %) puis 5 minutes dans le tampon de transfert. Des éponges (appelées « stacks ») sont également incubées dans le tampon de transfert. L'assemblage de transfert est ensuite réalisé dans une cassette du Trans-Blot® Turbo™ (BioRad, USA) (de bas en haut : stacks, membrane, gel, stacks).. L'électro-transfert des protéines du gel sur membrane est réalisé grâce au programme « *BioRad Mixed molecular weight* » (7 minutes) proposé par le Trans-Blot® Turbo™ (voir réactifs et matériels, Tableau 2.14.).

2.7.3.4. Marquage en immunofluorescence des protéines

2.7.3.4.1. Méthode

Après transfert des protéines sur membrane, celle-ci est activée dans du méthanol (100 %) durant 1 min, puis incubée dans une solution bloquante (Odyssey blocking buffer, diluée deux fois dans du PBS) pendant 1 h à TA. La membrane est ensuite incubée avec la solution d'anticorps primaire (voir Tableau 2.16.) pendant 16 h à 4°C. Les solutions d'anticorps sont préparées dans une solution bloquante (Odyssey blocking buffer) (100%) (Licor, USA) avec 0,1% de Tween-20 (BioRad, USA) et la dilution requise pour chaque anticorps (voir colonne 4). La membrane est ensuite rincée trois fois durant 5 min avec une solution de PBS-Tween-20 (0,1 %). La membrane est ensuite incubée avec la solution d'anticorps secondaire (voir Tableau 2.15.) durant 1 h à TA, puis rincée trois fois durant 5 min avec du PBS-Tween-20 (0,1 %) et enfin, rincée deux fois avec du PBS. La membrane est alors mise à sécher durant 30 min à 37°C puis scannée à l'aide de l'Odyssey Scanner (ODY-1896) (voir réactifs et matériels, Tableau 2.15. et 2.16.).

L'immunodétection de l'α-tubuline ou de la β-actine est utilisée comme contrôle de charge pour s'assurer du chargement d'une même quantité de protéines pour chaque échantillon. Pour ces anticorps, les temps d'incubation de la membrane avec les solutions bloquante et d'anticorps primaire et secondaire sont limités à 30 min, en raison de l'abondance de ces protéines dans les échantillons.

2.7.3.4.2. Quantification

L'intensité du signal de fluorescence des protéines d'intérêt est quantifiée à l'aide du logiciel Odyssey Software (Licor, USA) puis est normalisée par le signal de fluorescence correspondant obtenu pour l'immuno-détection du contrôle de charge utilisé (α-tubuline ou β-actine). Le rapport de la forme phosphorylée et de la forme totale de la protéine pour les kinases p38, mTOR et S6K est quantifié comme suit :

$$\boldsymbol{Activation\ ratio} = \frac{\boldsymbol{Signal_{p-protéine}\ normalisé}}{\boldsymbol{Signal_{protéine\ totale}\ normalisé}}$$

2.8. Marquage des mitochondries et des lysosomes sur cellules vivantes

2.8.1. Méthode de marquage des organites à l'aide de sondes fluorescentes

Les monocytes THP-1 ont été ensemencés dans des chambres Lab-Tek® 2-puits (Nalge Nunc International, USA) à raison de 80 000 cellules par puits et différenciés en macrophages M0 selon la méthode expliquée au point 2.2.2.2. Après différenciation, les THP-1 ont été incubés dans des milieux de culture RPMI contenant 8 mg/ml de « Sugar mix » ou de Revamil® en présence ou en absence de LPS (100 ng/ml) (*E. coli* sérotype 0111:B4 – Sigma, USA) durant 2, 12 et 24 h.

Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des chambres Lab-Tek® 2-puits à raison de 10 000 cellules par puits et incubés dans les mêmes conditions que les macrophages THP-1.

Tableau 2.17. Réactifs et matériels nécessaires pour le marquage d'organites sur cellules vivantes.

Format de culture	Lab-Tek® 2-puits (4 cm /puit) (Nalge Nunc International, USA)
Cellules	RAW264.7 : 30 000 cellules/puit THP-1 : 80 000 cellules/puit
Solutions	Milieux de culture : - DHG-L1 + 10% HIS - RPMI complet + 10% HIS
Sondes	- MitoTracker® Green (Molecular Probes, USA) → *Reconstituée avec 74,4 µl de DMSO* → *Concentration d'utilisation : 100 nM dans du milieu de culture* - LysoTracker® Red DND-99 (Molecular probes, USA) → *Concentration d'utilisation : 100 nM dans du milieu de culture*
Matériel supplémentaire	- Broadbend Confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Germany)

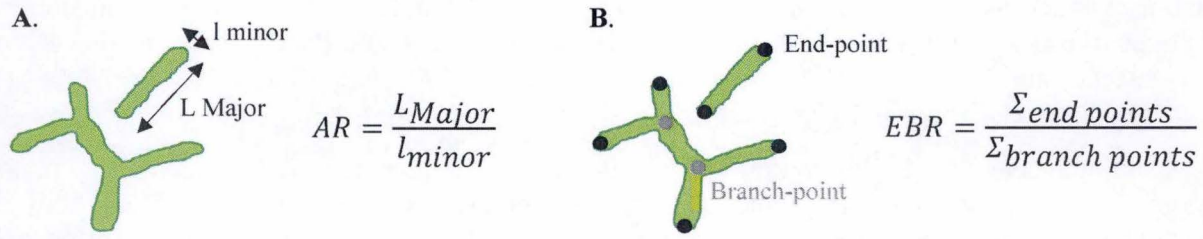


Figure 2.4. Formules de l'aspect ratio (AR) et de l'end-point / branch-point ratio (EBR).

A. L'AR est le ratio entre le « L_{Major} » (longueur) et le « l_{minor} » (largeur) d'un fragment mitochondrial. Pour chaque cellule, la moyenne des AR de chaque fragment est calculée. **B.** L'EBR est le ratio entre la somme des « end-points » (points terminaux) et la somme des « branch-points » (points de connexion) de tous les fragments mitochondriaux.

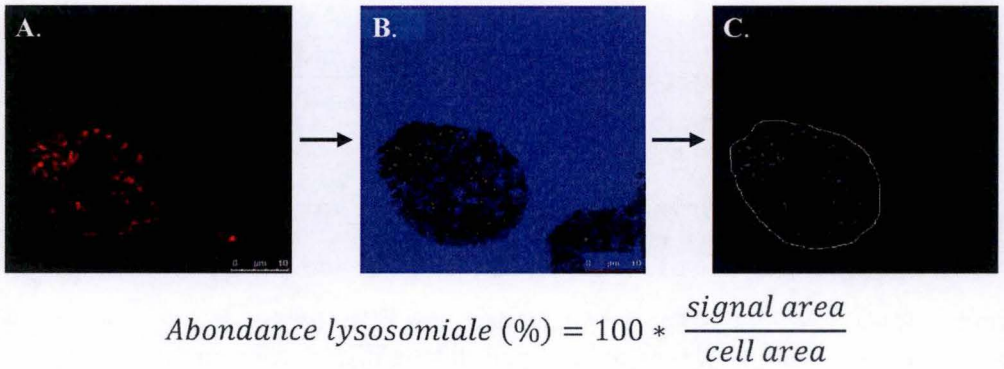


Figure 2.5. Quantification de l'abondance lysosomale par cellule avec le logiciel ImageJ.

L'objectif est de quantifier la surface occupée par les lysosomes par cellule en calculant le ratio (%) entre l'aire du signal LysoTracker® Red DND-99 et l'aire de la cellule. La micrographie acquise au microscope confocal (**A.**) ne permettant pas de visualiser les limites de la cellule, cette dernière est rendue visible à l'aide d'un filtre proposé par le logiciel ImageJ (HiLo) (**B.**). Ce filtre exagère artificiellement le signal du bruit de fond et permet de visualiser les limites de la cellule. Le contour de la cellule peut alors être délimité (manuellement) (**C.**) et le logiciel calcule l'aire de la surface délimitée ainsi que l'aire du signal au sein de la cellule délimitée.

Au terme des incubations, les cellules sont incubées dans du milieu X contenant 100 nM de MitoTracker® Green (qui, selon la firme Molecular Probes, marque les lipides mitochondriaux indépendemment du potentiel membranaire mitochondrial) ou 100 nM de LysoTracker® Red DND-99 (qui, selon la firme Molecular Probes, possède un fluorochrome acidotropique lié à une base faible, permettant de marquer les compartiments cellulaires acides dont les lysosomes) pendant 30 min dans une étuve à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO_2. Les cellules sont ensuite rincées par 1,5 mL du milieu de culture frais et observées au microscope confocal. Un nombre d'environ 30 micrographies ont été acquises pour chaque condition dans le but de quantifier les abondances des organites et/ou leur morphologie (voir réactifs et matériels, Tableau 2.17.).

2.8.2. Analyse de la morphologie du réseau mitochondrial

La morphologie du réseau mitochondrial mis en évidence par le MitoTracker® green est analysée grâce au logiciel ImageJ selon deux paramètres : l'aspect ratio mitochondrial (AR) et l'end-point / branch-point ratio (EBR) (Figure 2.4.). L'AR correspond au ratio entre la longueur et la largeur d'un fragment mitochondrial. L'AR donne ainsi une idée de l'élongation du réseau mitochondrial. Pour chaque cellule, la moyenne des AR de chaque fragment mitochondrial est calculée. L'EBR correspond, quant à lui, au ratio entre la somme des extrémités « end-points » et la somme des points de connexion « branch-points » de tous les fragments mitochondriaux de la cellule analysée. L'EBR donne ainsi une estimation de l'état connecté ou fragmenté du réseau mitochondrial (Vannuvel *et al.*, 2015).

2.8.3. Analyse de l'abondance lysosomale

L'abondance lysosomale de chaque cellule est quantifiée grâce au logiciel ImageJ en calculant le ratio (pourcentage) entre l'aire du signal LysoTracker® Red DND-99 au sein de la cellule analysée et l'air de cette cellule. N'ayant pas utilisé de marqueur permettant de visualiser la membrane cytoplasmique, les limites de la cellule analysée sont mises en évidence grâce à un filtre « HiLo » proposé par le logiciel (Figure 2.5.).

2.9. Cytométrie de flux

2.9.1. Principe

L'abondance des mitochondries et des lysosomes a également été recherchée par l'analyse des signaux de fluorescence obtenus en cytométrie de flux pour des cellules incubées en présence de « Sugar mix » ou de Revamil® et marquées par les sondes fluorescentes (Mitotracker Green et/ou Lysotracker Red).

Cette technique permet de compter et de caractériser un grand nombre de cellules (20 000 généralement) à une vitesse de 1000 cellules par seconde (analyse à « haut débit »). Les cellules se retrouvent en suspension dans un flux laminaire qui est tel que les cellules sont analysées individuellement en passant devant un laser qui excite le fluorochrome de la sonde présente dans les cellules. La caractérisation des cellules est basée sur l'analyse de la lumière réémise par le fluorochrome excité. Ce signal est orienté et filtré par des miroirs dichroïques et des filtres « bandes-passantes » dans un intervalle de longueurs d'onde spécifique à chaque signal réémis. Ceci permet également d'éviter les recouvrements entre signaux réémis par les fluorochromes. Le signal lumineux est finalement converti et amplifié par des photomultiplicateurs (PMT) qui le transforment en impulsion électrique (reçue au niveau de détecteurs) dont l'intensité est proportionnelle à l'énergie lumineuse.

Tableau 2.18. Réactifs et matériels nécessaires pour la cytométrie de flux.

Format de culture	Plaques 6-puits (10 cm /puit) (Corning-Costar, USA)
Cellules	RAW264.7 : 150 000 cellules/puit
Solutions	- HBSS (-Ca^{2+}, -Mg^{2+}, -phénol red) (Gibco, USA) - Eau distillée
Sondes	- MitoTracker® Green (Molecular Probes, USA) → *Reconstituée avec 74,4 µl de DMSO* → *Concentration d'utilisation : 100 nM dans de l'HBSS* - LysoTracker® Red DND-99 (Molecular probes, USA) → *Concentration d'utilisation : 100 nM dans de l'HBSS*
FACS	- FACSVerse (BD Biosceinces, USA) – Laser bleu (λ d'excitation : 488 nm) → *Canal FITC (λ d'émission : 500 – 550 nm)* → *Canal PE-CF594 (λ d'émission : 575 – 610 nm)* - Tubes pour FACS (5 ml) (BD Biosciences, USA) - Billes de calibration – FACSuite research beads (BD Biosciences, USA) - FACSflow (BD Biosciences, USA) - Logiciel FACSuite (BD Biosciences, USA)
Matériel supplémentaire	- Centrifugeuse 5810R (Eppendrof, Germany)

2.9.2. Analyse de l'abondance des organites

Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des plaques 6-puits à raison de 10^6 cellules par puit et traités été traités avec des solutions de Sugar mix ou Revamil® (8 mg/ml de milieu de culture) en présence ou non de LPS (100 ng/ml) (*E. coli* sérotype 0111:B4 – Sigma, USA) durant 2, 12, 24 et 48 heures. Pour le timing 48 heures, les cellules ont été pré-incubées avec les solutions de Sugar mix ou Revamil® durant 24 heures, puis incubées 24 heures supplémentaires en présence ou non de LPS.

Au terme des différentes incubations, les cellules sont marquées pendant 30 min (atmosphère humide à 37°C et contenant 5 % de CO_2) avec 100 nM de MitoTracker® green, ou 100 nM de LysoTracker® Red DND-99. Les cellules sont ensuite rincées avec 1 mL de l'HBSS sans calcium ni magnésium et détachées délicatement du puits avec un grattoir. Les cellules sont ensuite transférées dans des tubes de 5 mL pour cytomètre de flux et centrifugées à 1200 rpm durant 5 min à 4°C. Enfin, les cellules sont resuspendues dans 700 µl de HBSS frais. Les cellules marquées sont analysées avec le FACSVerse (BD Biosciences, USA). Le signal de fluorescence du MitoTracker® green a été mesuré sur le canal FITC (500 – 550 nm) et le signal de fluorescence du LysoTracker® red DND-99 a été mesuré sur le canal PE-CF594 (575 – 610 nm). Les résultats ont enfin été analysés avec le logiciel FACSuite (BD Biosciences, USA) (voir réactifs et matériels, Tableau 2.18.).

2.10. Analyses statistiques

La signification statistique (p-value <0,05) des résultats obtenus en réplicas biologiques indépendants (n=3) a été déterminée par un test ANOVA I suivi d'un post-test de Tukey. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.

RESULTATS

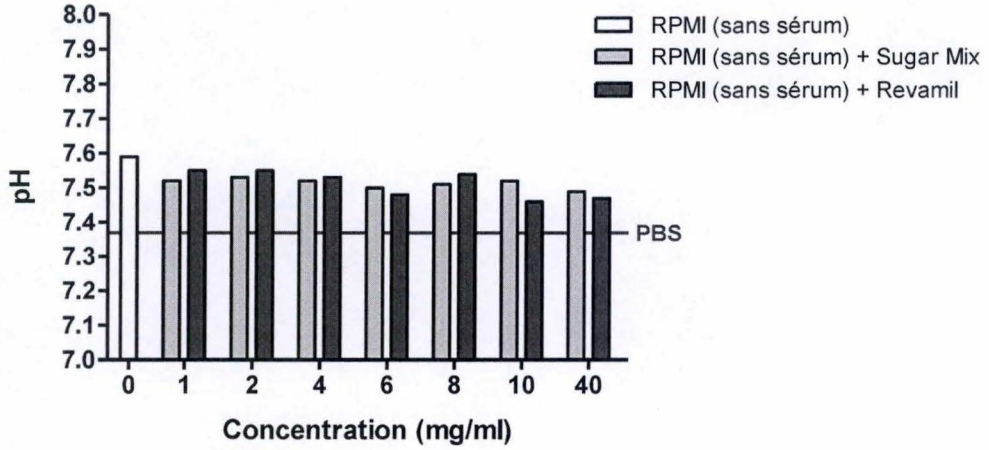


Figure 3.1. Effet du Revamil® sur le pH du milieu de culture RPMI ne contenant pas de sérum.

Des solutions contenant différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) de Revamil® (colonnes gris clair) ou de « Sugar mix » (colonnes gris foncé) ont été préparées dans du milieu de culture RPMI 1640 sans sérum, milieu dont le pH a également été mesuré (colonne blanche). Le pH des milieux et des solutions préparées a ensuite été mesuré, à température ambiante, à l'aide d'un pH-mètre analytique standard. Une solution de PBS à pH 7,4 a été utilisée comme référence.

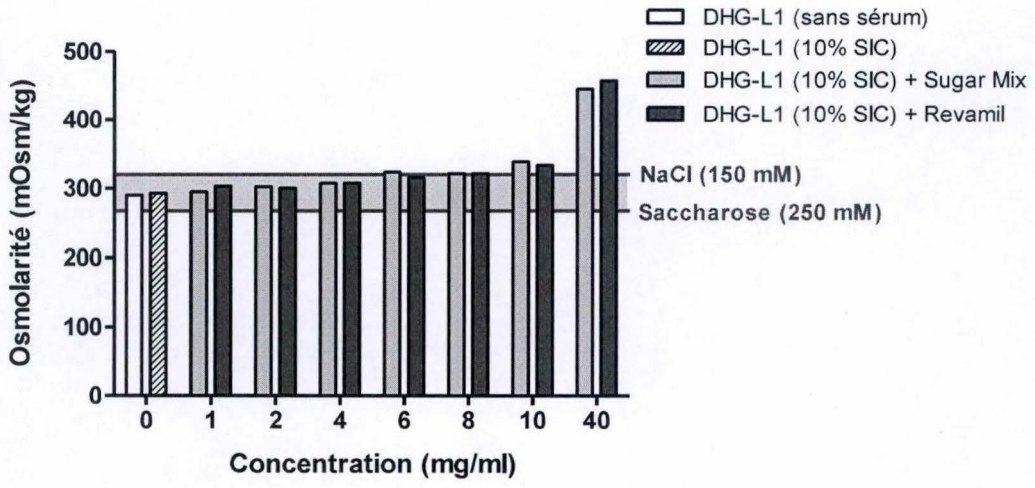


Figure 3.2. Effet du Revamil® sur l'osmolarité du milieu de culture DHG-L1.

Des solutions contenant différentes concentrations (1, 2, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) de Revamil® (colonnes gris clair) ou de « Sugar mix » (colonnes gris foncé) ont été préparées dans du milieu de culture DHG-L1 supplémenté (colonne hachurée) ou non (colonne blanche) de 10 % de sérum inactivé à la chaleur (SIC). L'osmolarité des solutions préparées a ensuite été mesurée avec un Micro-osmomètre calibré Type 6. Les osmolarités d'une solution de NaCl (150 mM) ou de saccharose (250 mM) ont également été mesurées et utilisées comme références.

3. RESULTATS

3.1. Optimisation des conditions expérimentales et caractérisation des modèles cellulaires utilisés

Ce mémoire ouvre un tout nouveau projet de recherche portant sur l'étude des effets du miel sur la biologie des organites cellulaires (mitochondries et lysosomes) et ne repose donc sur aucune donnée préliminaire. La première partie de ce mémoire a donc été consacrée à la caractérisation des modèles cellulaires utilisés pour les analyses biologiques et à l'optimisation des conditions expérimentales. En effet, de par sa composition, l'addition de miel dans du milieu de culture cellulaire est susceptible d'en affecter les composantes physico-chimiques telles que le pH ou l'osmolarité, deux paramètres pouvant modifier les réponses cellulaires basales et/ou induire un stress, menant à une altération de la viabilité cellulaire, à des changements de la prolifération cellulaire, ou encore des modifications dans les voies de signalisation et changements d'expression génique conduisant à la polarisation des macrophages.

3.1.1. Effets du Revamil® sur le pH du milieu de culture RPMI sans sérum

Le pH de solutions de milieu de culture RPMI sans sérum contenant différentes concentrations de « Sugar Mix » (une solution contrôle respectant une composition en sucres similaire à celle du Revamil® utilisée afin de discriminer les effets des sucres du Revamil® des autres composés spécifiques au miel) ou de Revamil® (1, 2, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) a été mesuré afin d'évaluer un effet potentiel de ces traitements sur le pH du milieu de culture (Figure 3.1). Quelle que soit la concentration testée, ni l'addition des différents sucres contenus dans le « Sugar Mix », ni l'addition de Revamil® n'affecte le pH du milieu de culture RPMI, comparé au milieu RPMI non-supplémenté. Ajoutons que les valeurs de pH mesurées sont légèrement plus élevées que le pH du PBS utilisé comme référence (pH : 7,38) car les milieux et solutions ont séjourné pendant plusieurs minutes en dehors d'une atmosphère contenant 5% de CO_2, un temps suffisant pour commencer à rendre les milieux tamponnés par le système H_2CO_3/HCO_3^- plus basiques. Le milieu de culture DHG-L1 (qui est supplémenté de 1,5 g/L de $NaHCO_3$) n'a pas été choisi pour cette analyse car le pH de ce milieu est plus rapidement augmenté en dehors de l'atmosphère contenant 5 % de CO_2.

3.1.2. Effets du Revamil® sur l'osmolarité du milieu de culture DHG-L1

Vu sa forte teneur en monosaccharides (75 % de fructose et de glucose (Missio da Silva *et al.*, 2016)), le Revamil® pourrait (en fonction de sa concentration dans le milieu de culture) accroître l'osmolarité du milieu de culture et ainsi générer un stress hyperosmotique pour les cellules.

3.1.2.1. Effets du Revamil® sur l'osmolarité du milieu de culture DHG-L1

L'osmolarité de solutions de milieu de culture DHG-L1 contenant différentes concentrations de « Sugar Mix » ou de Revamil® (1, 2, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) a été mesurée (Figure 3.2.). Les osmolarités de solutions iso-osmotiques contenant du NaCl (150 mM) ou du saccharose (250 mM) ont également été mesurées et utilisées comme référence. Les osmolarités des solutions contenant du « Sugar Mix » ou du Revamil® sont comparables quelle que soit la concentration testée. Pour le Revamil® et la solution « Sugar mix », l'osmolarité des solutions de concentrations comprises entre 1 et 8 mg/ml est comparable à l'osmolarité obtenue pour les solutions de référence de NaCl et de saccharose. Notons qu'à une concentration plus élevée correspondant à 40 mg/ml, les osmolarités des solutions de « Sugar Mix » et de Revamil® sont supérieures à 400 mOsm/kg.

3.1.2.2. Effets du Revamil® sur l'activation de la MAPK p38

Nous venons de montrer par une méthode analytique que l'addition de Revamil® ou de « Sugar mix » ne modifiait pas (ou peu) l'osmolarité des milieux de culture pour des concentrations inférieures à 10 mg/ml. Afin de tester si les solutions de « Sugar Mix » ou de Revamil® provoquent (ou non) un

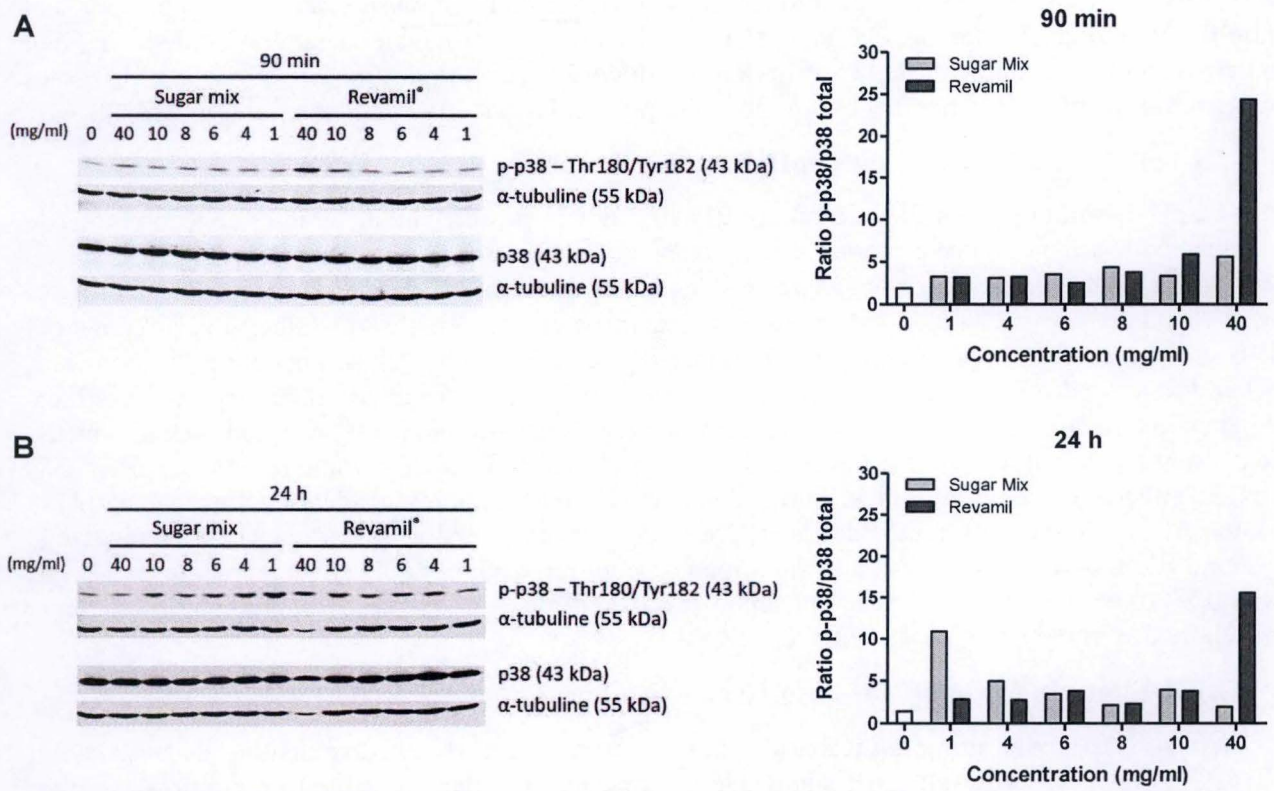


Figure 3.3. Effet du Revamil® sur l'activation de la MAPK p38.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés en présence de solutions contenant différentes concentrations (1, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) de Revamil® ou de « Sugar mix » préparées dans du milieu de culture DHG-L1 supplémenté de 10 % de SIC, pendant (**A**) 90 min ou (**B**) 24 h. Des cellules non-traitées ont été utilisées comme contrôle négatif (colonne blanche). Les abondances de la forme phosphorylée p-p38 (43 kDa) (forme active) et de la forme totale de l'enzyme p38 (43 kDa) ont été analysées par western-blot en fluorescence (à gauche). Les abondances de p-p38 et p38 ont été quantifiées et normalisées par rapport à l'abondance de l'α-tubuline (55 kDa) dont l'immuno-détection a été utilisée comme contrôle de charge. Dans les graphiques de droite, les résultats sont exprimés comme les ratio entre l'abondance normalisée de p-p38 et l'abondance normalisée de p38 (n=1).

stress hyperosmotique pour des macrophages RAW264.7, le niveau d'activation de la MAPK de stress p38, un marqueur intra-cellulaire connu pour être activé par phosphorylation dans des cellules rénales HEK293 et des macrophages BMDM, en réponse à un stress hyperosmotique (Uhlik *et al.*, 2003; Cuenda and Rousseau, 2007), a été analysé. Les abondances de la forme active et phosphorylée de l'enzyme sur les résidus Thr180/Tyr182 (p-p38) et de la forme totale de p38 ont été analysées par une technique de western-blot en fluorescence à partir de 15 µg de protéines de lysats cellulaires. Ces lysats ont été préparés à partir de macrophages RAW264.7 incubés pendant 90 min (Figure 3.3A.) ou 24 h (Figure 3.3B.) avec des solutions contenant différentes concentrations de « Sugar Mix » ou de Revamil® (1, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml). Les abondances des différentes formes protéiques ont été normalisées par rapport à l'abondance de l'α-tubuline, dont l'immuno-détection est utilisée comme contrôle de charge. Le degré de phosphorylation de p38 a ensuite été calculé selon un ratio entre l'abondance normalisée de la forme phosphorylée de l'enzyme (p-p38) et l'abondance normalisée de la forme totale de p38. Les résultats montrent que, excepté pour la concentration de 40 mg/ml, les solutions de « Sugar Mix » ou de Revamil® ne conduisent pas une forte phosphorylation de p38, en comparaison du niveau de phosphorylation de l'enzyme dans les cellules contrôles non-traitées. De plus, aucune différence n'est observée entre la phosphorylation de l'enzyme dans les cellules incubées en présence de Revamil® et la phosphorylation de p38 dans des cellules incubées en présence de « Sugar Mix » et ce, que ce soit pour 90 min ou 24 h d'incubation en présence de concentrations inférieures ou égales à 8 mg/ml. Ces résultats suggèrent qu'à des concentrations de 8 mg/ml ou inférieures, les macrophages ne semblent pas souffrir d'un stress hyperosmotique en présence de miel ou de la solution de sucre utilisée comme contrôle tout au long de ce travail, ce qui est en accord avec les mesures directes d'osmolarité obtenues rapportées au ci-dessus au point 3.1.2.1.

3.1.3. Effets du Revamil® sur la viabilité des cellules RAW264.7 et THP-1

Dans la suite de notre travail, nous avons utilisé des macrophages RAW264.7 murins ainsi que des macrophages obtenus à partir de monocytes THP-1 humains en suspension. L'intérêt d'utiliser deux types cellulaires différents était : 1) de voir si les résultats obtenus peuvent être observés dans deux types cellulaires différents et d'espèces différentes, 2) de bénéficier, avec les cellules THP-1, d'un type cellulaire, qui une fois différencié, présente un phénotype plus « étalé » sur le substrat et 3) d'utiliser des macrophages (RAW264.7) qui ne demandent pas de traitement de différenciation avec des molécules susceptibles de changer la biologie de la cellule.

Nous avons voulu rechercher une concentration optimale et définir des temps d'incubation des cellules en présence de solutions de « Sugar Mix » et de Revamil® compatibles avec la viabilité cellulaire. L'objectif est donc de déterminer la concentration la plus élevée de Revamil® et de « Sugar Mix » n'affectant pas (ou peu) la viabilité des cellules comparée à des cellules non-traitées.

Les macrophages RAW264.7 et les monocytes THP-1 (en suspension) ont été ensemencés dans des plaques de culture à 24-puits à des densités respectivement de 25 000 cellules/puits et 80 000 cellules/puits pendant 24, 48 et 72 h en présence de milieux de culture contenant des concentrations de « Revamil® » ou de « Sugar Mix » comprises entre 1 et 40 mg/ml pour les RAW264.7 et comprises entre 1 et 10 mg/ml pour les THP-1. La viabilité cellulaire a été analysée par un dosage de l'activité de la LDH libérée dans le milieu de culture. La libération de cette enzyme de 140 kDa est utilisée comme un marqueur d'une éventuelle perméabilisation de la membrane plasmique suggérant une mort cellulaire de type nécrose/nécroptose (Chan *et al.*, 2013). Pour des cellules adhérentes, le dosage de la LDH est également réalisé sur des cellules qui se seraient détachées du substrat mais qui auraient conservés une membrane plasmique intacte et que l'expérimentateur perméabilise volontairement à l'aide de PBS-Triton-X-100 (2%) pendant 10 minutes. Enfin, toujours pour les cellules adhérentes, l'activité de la LDH associée au tapis de cellules restées adhérentes est également dosée suite à un traitement de la monocouche de cellules avec du PBS-Triton-X-100 (2%) pendant 10 minutes. Les pourcentages de libération de la LDH sont calculés à partir du dosage colorimétrique de l'activité de

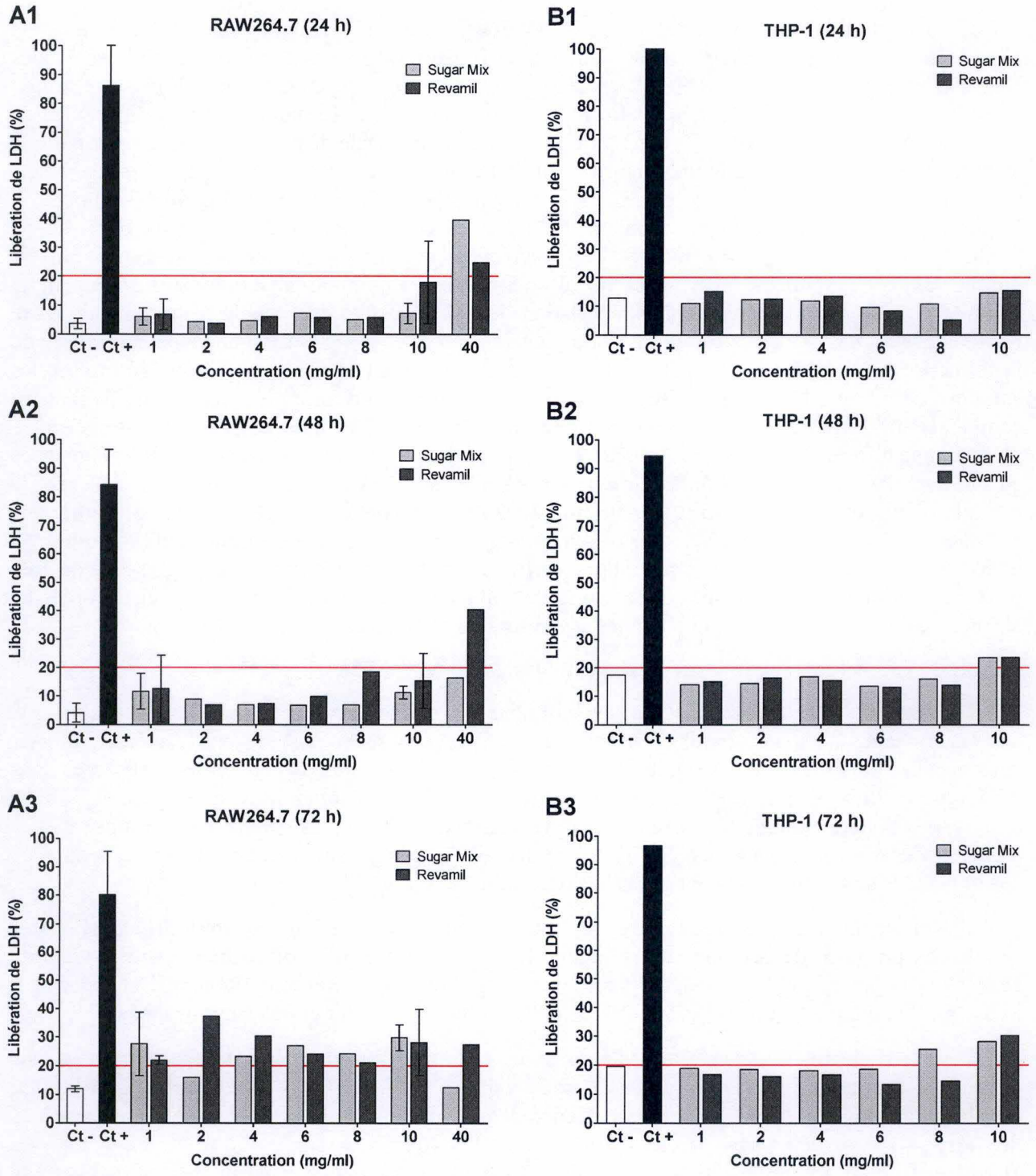


Figure 3.4. Effet du Revamil® sur la viabilité des RAW264.7 et THP-1.

(**A**) Des macrophages RAW264.7 et (**B**) des monocytes THP-1 ont été incubées en présence de solutions contenant différentes concentrations (1, 4, 6, 8, 10 et 40 mg/ml) de Revamil® ou de « Sugar mix » préparées, respectivement, dans du milieu de culture DHG-L1 ou RPMI, supplémenté de 10 % de SIC, pendant 24 (**A1/B1**), 48 (**A2/B2**) et 72 h (**A3/B3**). Des cellules non-traitées ont été utilisées comme contrôle négatif (colonnes blanches) et des cellules traitées avec du PBS-Triton-X-100 (2 %) ont été utilisées comme contrôle positif (colonnes noires). La viabilité cellulaire est évaluée à l'aide d'un kit de détection de cytotoxicité (Roche, Switzerland) basée sur le dosage d'activité enzymatique de la LDH libérée dans le milieu suite à une perméabilisation de la membrane plasmique. Le seuil de cytotoxicité « acceptable » a été arbitrairement placé à 20 %. Les résultats, exprimés en pourcentages de libération de la LDH, représentent, pour le contrôle négatif et les RAW264.7 (pour les concentrations de 1 mg/ml et 10 mg/ml) la moyenne ± 1 écart-type (S.D.) pour trois réplicats biologiques indépendants (n=3). Les autres résultats sont exprimés en pourcentages de libération de la LDH et représentent la moyenne pour deux réplicats biologiques indépendants (n=2).

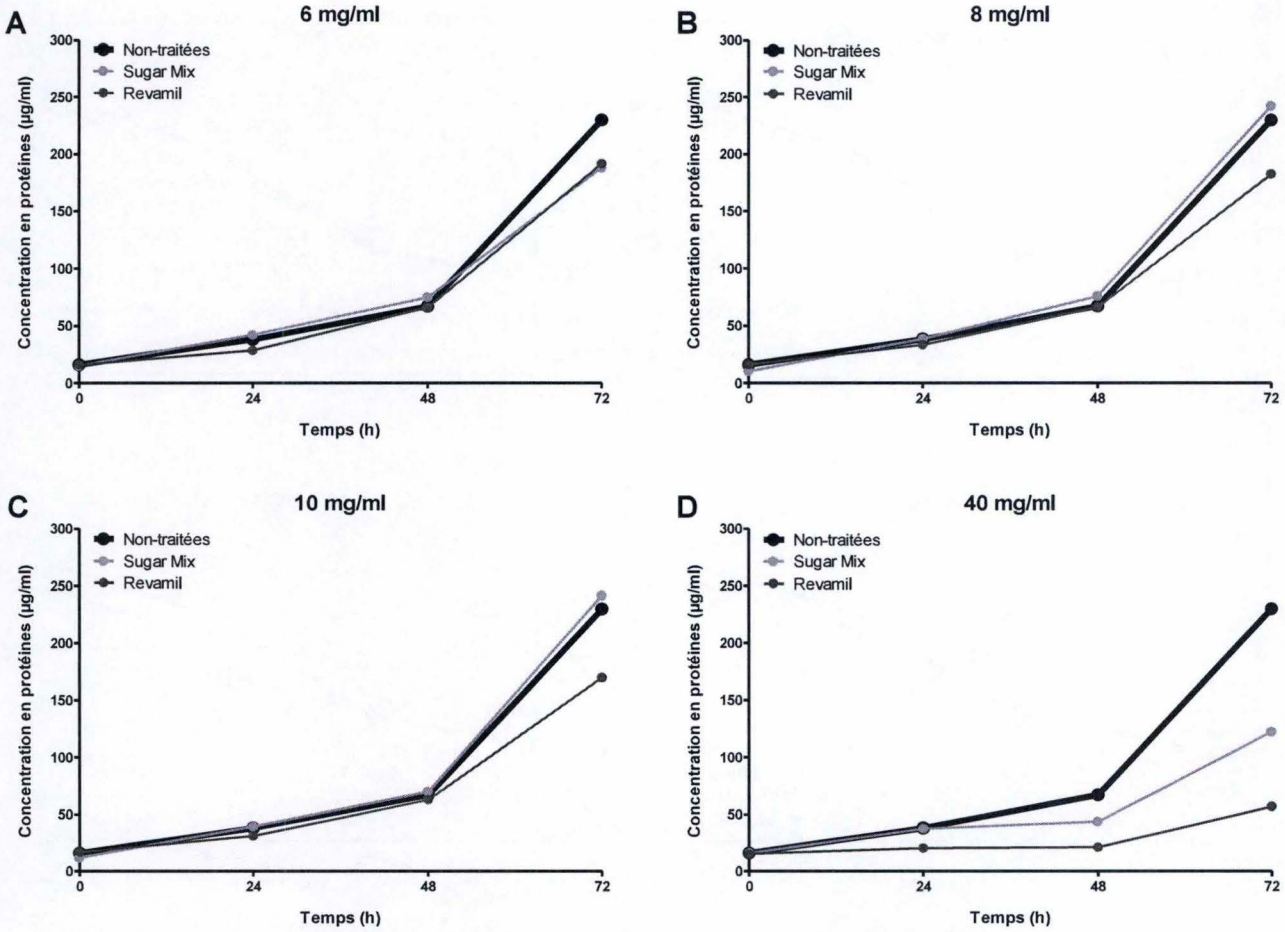


Figure 3.5. Effet du Revamil® sur la prolifération des macrophages RAW264.7.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés pendant 24, 48 et 72 h avec des solutions contenant différentes concentrations (6 (**A**), 8 (**B**), 10 (**C**) et 40 (**D**) mg/ml) de Revamil® (courbe gris foncé) ou de « Sugar mix » (courbe gris clair) préparées dans du milieu de culture DHG-L1 supplémenté de 10 % de SIC. Des cellules non-traitées ont été utilisées comme cellules contrôles (courbe noire). La prolifération cellulaire est déterminée par un dosage protéique basé sur la réaction de Folin à partir de 200 µl d'hydrolysats de cellules. Les résultats sont exprimés en µg/ml et représentent les moyennes pour deux réplicats biologiques indépendants (n=2).

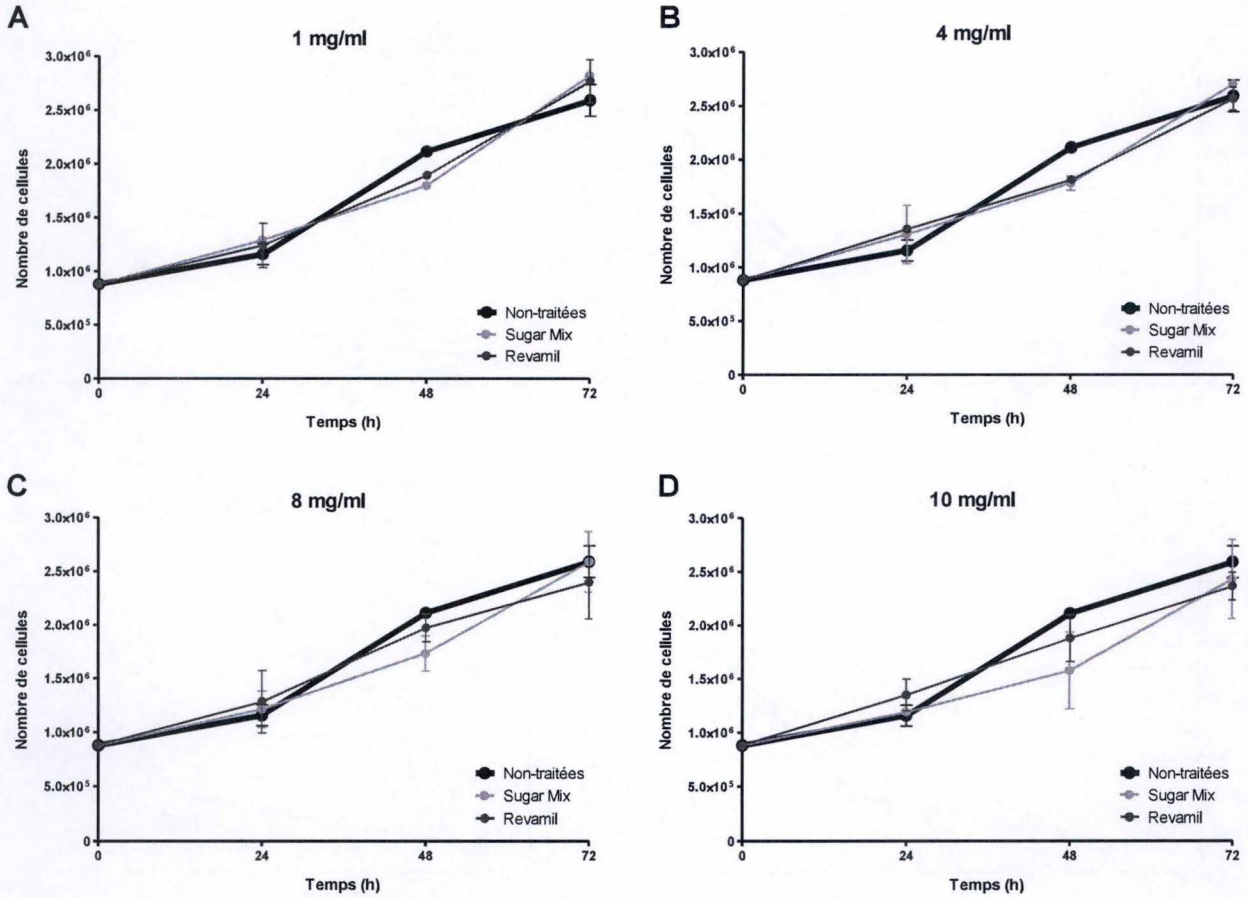


Figure 3.6. Effet du Revamil® sur la prolifération des monocytes THP-1.

Des monocytes THP-1 ensemencés dans des boîtes de culture T25 (25 cm²) à une densité de 880 000 cellules/boîte ont été incubés pendant 24, 48 et 72 h avec des solutions contenant différentes concentrations (1 (**A**), 4 (**B**), 8 (**C**) et 10 (**D**) mg/ml) de Revamil® (courbe gris foncé) ou de « Sugar mix » (courbe gris clair) préparées dans du milieu de culture RPMI supplémenté de 10 % de SIC. Des cellules non-traitées ont été utilisées comme contrôle (courbe noire). La prolifération cellulaire a été déterminée par des comptages cellulaires avec un Countess® Automated Cell Counter. Les résultats sont exprimés en nombre total de cellules et représentent les moyennes ± 1 S.D. pour trois réplicats biologiques indépendants (n=3).

l'enzyme (voir Matériel et Méthodes, point 2.4.). Bien que ce pourcentage doive être le plus petit possible pour refléter une culture cellulaire ne présentant pas de mortalité cellulaire, en fonction du type cellulaire considéré et du traitement appliqué, des pourcentages de libération de LDH compris entre 10 et 20 % sont admis comme acceptables puisque des pourcentages comparables sont obtenus pour la libération spontanée de LDH observée pour des cultures de cellules contrôles (non-traitées).

Les résultats montrent que, tant pour les RAW264.7 (Figure 3.4A.) que pour les THP-1 (Figure 3.4B.), des concentrations de Revamil® ou de « Sugar Mix » comprises entre 1 et 8 mg/ml ne semblent pas affecter la perméabilité cellulaire, au moins pendant les 48 premières heures d'incubation. De plus, pour une concentration donnée, aucune différence de libération de LDH n'est observée entre des cellules incubées avec du Revamil® et des cellules exposées au « Sugar Mix ». Les RAW264.7 semblent toutefois un peu plus sensibles que les THP-1, puisque la libération de LDH observée pour ces cellules est, pendant les dernières 24 h d'une incubation de 72 h en présence de « Sugar Mix » ou de Revamil®, légèrement plus élevée que celle obtenue pour des THP-1.

Ces résultats montrent qu'une concentration de 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix » ne semble pas affecter la viabilité cellulaire. Cette concentration sera conservée pour la suite des expériences de ce travail portant sur la biologie des organites. Cependant, une absence de toxicité ne signifie pas automatiquement que la cellule ne puisse pas voir sa biologie modifiée et notamment son cycle cellulaire. Nous avons donc recherché les effets éventuels du Revamil® ou du « Sugar Mix » sur la prolifération des cellules RAW264.7 et THP-1.

3.1.4. Effets du Revamil® sur la prolifération des cellules RAW264.7 et THP-1

Afin d'analyser l'effet potentiel du Revamil® et du « Sugar Mix » sur la prolifération cellulaire, deux types de tests ont été utilisés en fonction du type cellulaire utilisé. Des dosages protéiques basés sur la méthode de Folin ont été choisis pour les macrophages RAW2646.7 (adhérents), tandis que la prolifération des monocytes THP-1 (cellules cultivées en suspension) a été analysée par des comptages cellulaires.

Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des plaques de culture à 6-puits à une densité de 150 000 cellules/puits, puis incubés avec différentes concentrations de de Revamil® ou de « Sugar Mix » (6, 8, 10 et 40 mg/ml) pendant 24, 48 et 72 h. Au terme de ces incubations, des dosages protéiques ont été réalisés pour déterminer la biomasse des cellules et suivre son évolution en réponse aux traitements (Figure 3.5.). Les résultats montrent que les concentrations de Revamil® ou de « Sugar Mix » comprises entre 6 et 10 mg/ml n'affectent pas (ou n'affectent que peu) la prolifération des macrophages RAW264.7, par rapport à la prolifération de cellules contrôles non-traitées. Cependant, à 40 mg/ml, la prolifération des macrophages RAW264.7 est inhibée et ce, aussi bien en présence de « Sugar Mix » que de Revamil®. De plus, pour chaque concentration testée, le Revamil® semble diminuer la prolifération cellulaire à 72 h d'incubation. Afin de confirmer ces résultats, des monocytes THP-1 ont été incubés en présence de solutions contenant des concentrations de de Revamil® ou de « Sugar Mix » dans une gamme de concentrations plus étroite (1, 4, 8 et 10 mg/ml) pendant 24, 48 et 72 h (Figure 3.6.), Les résultats obtenus pour les monocytes THP-1 sont comparables à ceux obtenus pour les macrophages RAW264.7, suggérant qu'en dessous de 10 mg/ml, le Revamil® n'a que peu ou pas d'effet sur la prolifération cellulaire et ce, pour les deux types cellulaires utilisés dans ce travail.

Nous avons par conséquent décidé de travailler dans la suite de ce travail, avec la concentration de 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix ». En effet, cette concentration n'altère ni le pH ni l'osmolarité des milieux de culture. Elle ne provoque pas de stress hyperosmotique pour les macrophages, est compatible avec la viabilité cellulaire pendant au moins 48 h et n'affecte pas (ou n'affecte que peu) la prolifération cellulaire.

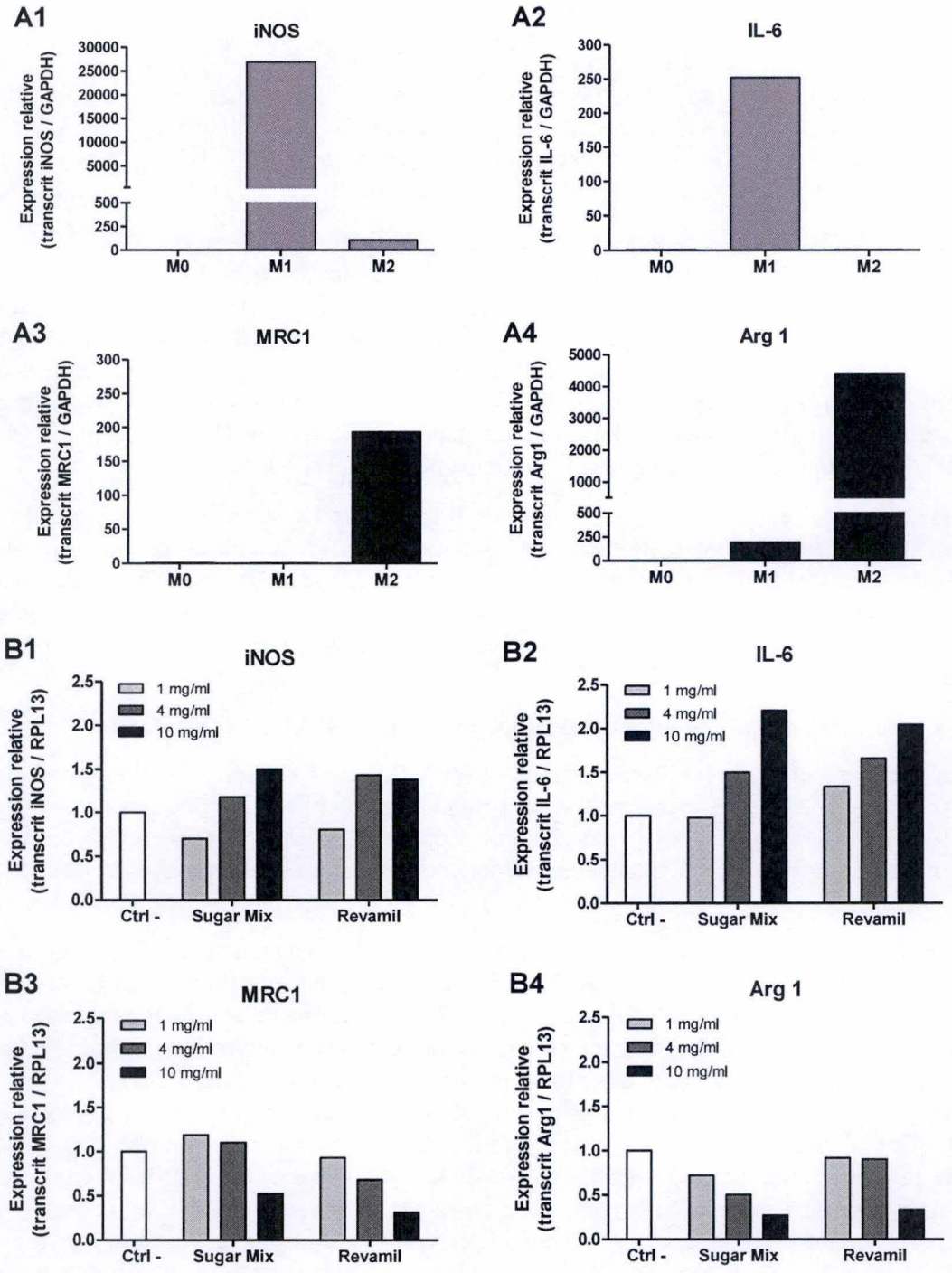


Figure 3.7. Effet du Revamil® sur l'expression de gènes marqueurs de la polarisation M1 et M2 des macrophages RAW264.7.

(**A**) Des macrophages RAW264.7 ont été polarisés en macrophages M1 et M2 (voir matériels et méthodes, point 2.2.1.2.). L'abondance relative des transcrits de deux gènes marqueurs du phénotype M1 (iNOS (**A1**) et IL-6 (**A2**)) et de deux gènes marqueurs du phénotype M2 (MRC1 (**A3**) et Arg 1 (**A4**)) ont été suivis par RT-qPCR. Les résultats sont calculés selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (normalisés par l'abondance du transcrit de la GAPDH utilisé comme gène de référence) et exprimés en abondances relatives des transcrits comparées au niveau d'expression de ces gènes dans des macrophages contrôles présentant un phénotype M0) (n=1). **(B)** Des macrophages RAW264.7 ont été incubés pendant 18 h en présence de solutions contenant différentes concentrations (1, 4 et 10 mg/ml) de Revamil® ou de « Sugar mix » et polarisés simultanément en macrophages M1 (en présence de 10 ng/ml de LPS et 20 ng/ml d'IFNγ) ou M2 (en présence de 20 ng/ml d'IL-4 et d'IL-13). Au terme des incubations, les abondances relatives des transcrits de l'iNOS (**B1**), de l'IL-6 (**B2**), de MRC1 (**B3**) et d'Arg 1 (**B4**) ont été déterminés par RT-qPCR. Les résultats sont calculés selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et normalisés par l'abondance du transcrit de RPL13 utilisé comme gène de référence et exprimés en abondances relatives des transcrits (comparées à l'abondance du transcrit du gène d'intérêt dans des cellules polarisées M1 (**B1**/**B2**) ou M2 (**B3**/**B4**) mais non incubées en présence de mile ou de sucres et utilisées comme contrôle négatif (colonnes blanches)) (n=1).

Afin de tester les effets éventuels du Revamil® sur les fonctions du macrophage, nous nous sommes d'abord intéressés aux effets potentiel du miel sur la polarisation des macrophages. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction (voir point 1.2.3.3.), il existe de nombreux types de macrophages (M0, M1, M2) possédant des caractéristiques différentes et des fonctions spécifiques dans la réaction inflammatoire.

3.1.5. Effets du Revamil® sur la polarisation de macrophages

3.1.5.1. Effets du Revamil® sur l'expression de gènes marqueurs de la polarisation M1 et M2 des macrophages RAW264.7

La polarisation des macrophages RAW264.7 en macrophages M1 (induite en réponse au LPS et à l'IFNγ) et M2 (induite en réponse à l'IL-4 et l'IL-13) a d'abord été contrôlée en analysant, par RT-qPCR, l'expression de certains gènes connus comme étant des marqueurs du phénotype M1 (*iNOS* et *IL-6*) (Figures 3.7A1. et 3.7A2.) et du phénotype M2 (*MRC1* et *Arg 1*) (Figures 3.7A3. et 3.7A4.). Les macrophages polarisés expriment bien les gènes marqueurs attendus.

Une fois le modèle de polarisation des macrophages RAW264.7 établi, l'effet potentiel du Revamil® sur l'expression de ces gènes a été testé. Les macrophages RAW264.7 ont été ensemencés à une densité de 750 000 cellules/puits dans des plaques de culture à 6-puits et incubés avec des solutions contenant différentes concentrations de Revamil® ou de « Sugar Mix » (1, 4, et 10 mg/ml) préparées dans des milieux de culture DHG-L1 contenant 10 ng/ml de LPS et 20 ng/ml d'IFNγ induisant la polarisation M1, ou contenant 20 ng/ml d'IL-4 et 20 ng/ml d'IL-13 induisant la polarisation M2. L'expression des gènes marqueurs a ensuite été analysée par RT-qPCR (Figure 3.7B.). Bien que préliminaires, les résultats montrent que le Revamil® ou le « Sugar Mix », à une concentration de 10 mg/ml, induisent une légère augmentation de l'expression des gènes marqueurs du phénotype M1 (*iNOS* et *IL-6*) et provoquent une diminution de l'expression des gènes marqueurs du phénotype M2 (*MRC1* et *Arg 1*). Ces modifications d'expression de gènes semblent dépendantes de la concentration de Revamil® ou de « Sugar Mix » utilisée. Cependant, le fait qu'il n'y ait pas de différence d'expression de ces gènes entre les traitements des cellules au Revamil® ou au « Sugar Mix » indique que ces modifications sont très probablement dues à la composition en sucres du miel, et non à des composés spécifiques présents dans le Revamil®. N'ayant pas obtenu de résultats discriminant le Revamil® de la solution « Sugar Mix » pour ce paramètre, nous avons décidé de ne pas poursuivre ces expériences et de nous focaliser, dans la suite de ce travail, sur la recherche d'effets potentiels du Revamil® sur les mitochondries et les lysosomes

3.1.5.2. Effets du Revamil® sur la morphologie mitochondriale et l'abondance lysosomale de macrophages THP-1 au cours de leur polarisation en macrophages M1 et M2

Les cellules THP-1 ont été choisies afin d'étudier un effet potentiel du Revamil® sur la morphologie de la population mitochondriale et sur l'abondance et la morphologie des lysosomes au cours de la polarisation des macrophages M0 en macrophages M1 et M2. Pour ces expériences, ces cellules ont été choisies préférentiellement aux macrophages RAW264.7 car, une fois différenciées, elles s'étalent et sont plus grandes que les macrophages RAW264.7, ce qui permet une observation et une analyse plus faciles de la morphologie des organites en microscopie confocale.

Des monocytes THP-1 ont donc été ensemencés à une densité de 80 000 cellules/puits dans des chambres Lab-Tek, puis différenciés en macrophages M0 par un traitement de 24 h en présence de PMA, une molécule connue pour activer de nombreuses voies de signalisation telles que les voies PKC/MAPK, PKC/NF-κB et PI3K/Akt/mTOR impliquées dans la survie cellulaire et l'initiation de l'inflammation (Weng *et al.*, 2008). Les macrophages THP-1 (M0) ont ensuite été incubés pendant 24 h ou 48 h dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix », en présence des molécules initiant la polarisation des macrophages THP-1 (M0) en macrophages M1 ou M2

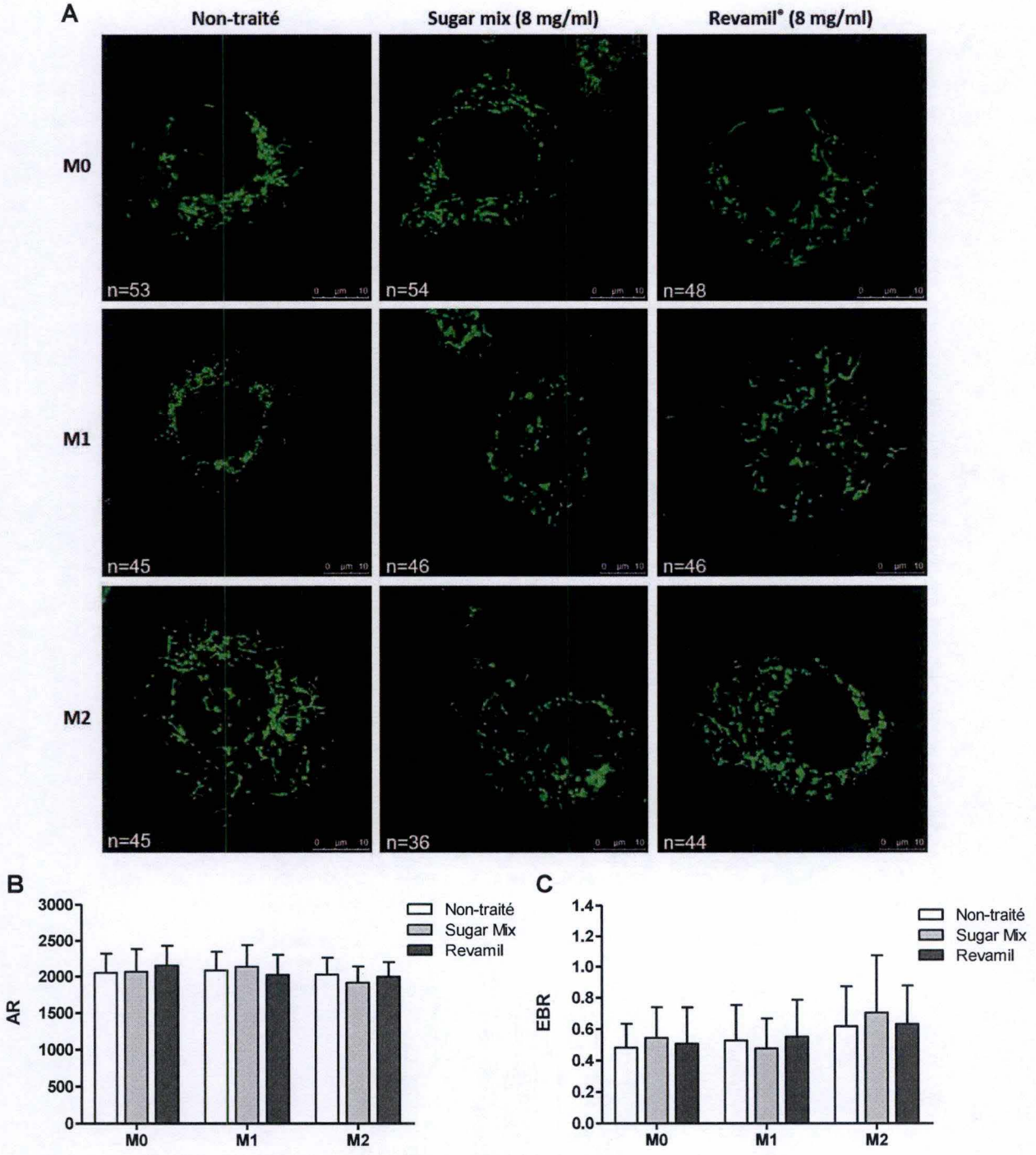


Figure 3.8. Effet du Revamil® sur la morphologie mitochondriale de macrophages THP-1 durant leur polarisation.

Des monocytes THP-1 ont été incubés dans du milieu de culture RPMI + 10 % de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar mix » pendant leur différentiation (M0) et leur polarisation (M1 et M2) (voir matériels et méthodes, point 2.2.2.2.). (**A**) Afin de marquer le réseau mitochondrial, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente MitoTracker® green (100 nM pendant 30 min). La morphologie du réseau mitochondrial est ensuite analysée sur les micrographies acquises au microscope confocal grâce au logiciel ImageJ selon deux paramètres : l'aspect ratio (AR) et l'end-point / branch-point ratio (EBR). (**B**) L'AR correspond au ratio entre la longueur et la largeur d'un fragment mitochondrial. Pour chaque cellule, la moyenne des AR de chaque fragment mitochondrial est calculée. (**C**) L'EBR correspond au ratio entre la somme des extrémités « end-points » et la somme des points de connexion « branch-points » de tous les fragments mitochondriaux d'une cellule analysée. Les résultats sont exprimés en moyennes ± 1 S.D. de la moyenne des AR (**B**) ou des EBR (**C**). Le nombre de cellules analysées provenant de deux expériences indépendantes est indiqué dans le coin inférieur gauche des micrographies.

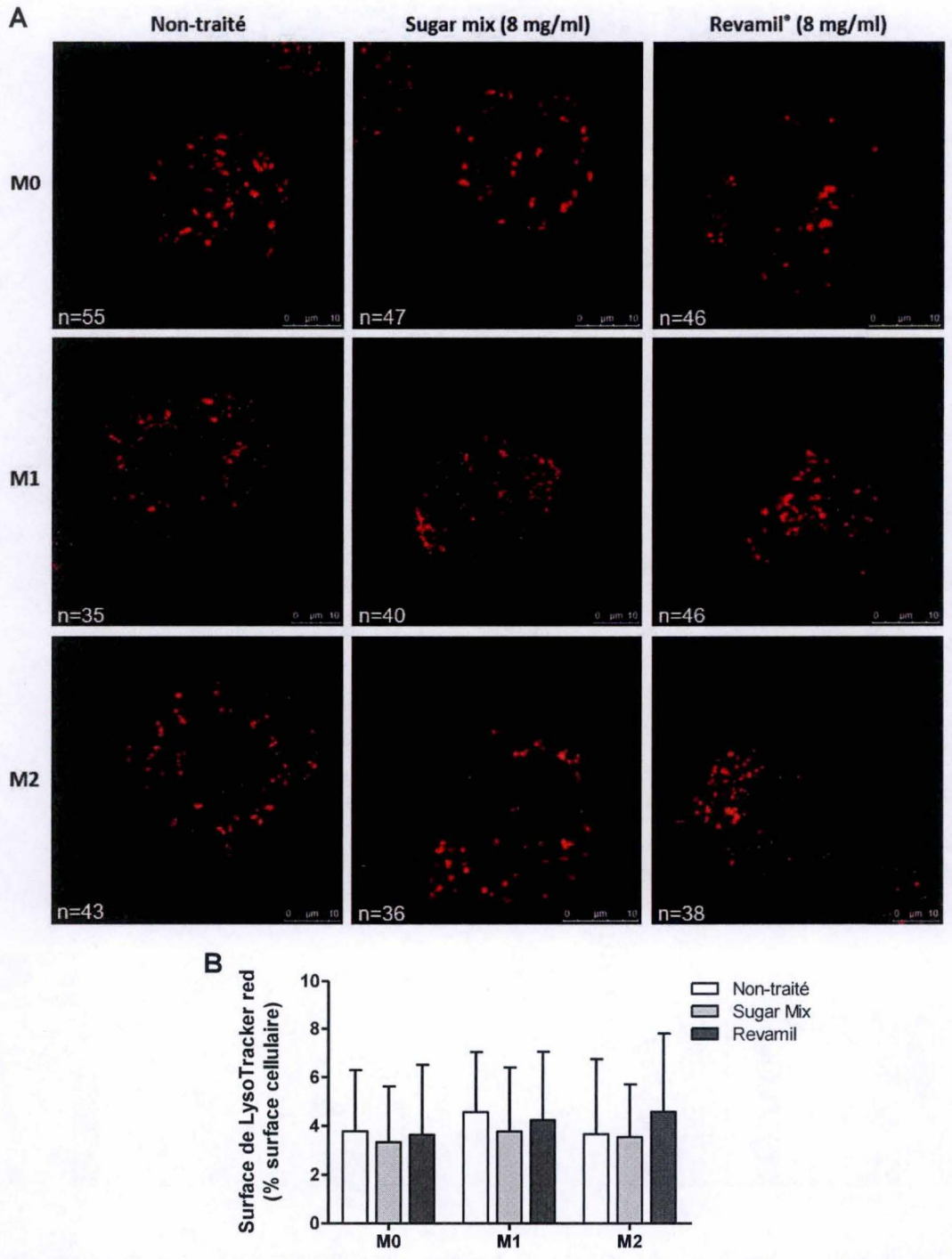


Figure 3.9. Effet du Revamil® sur l'abondance lysosomale de macrophages THP-1 durant leur polarisation.

Des monocytes THP-1 ont été incubés dans du milieu de culture RPMI + 10 % de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar mix » pendant leur différentiation (M0) et leur polarisation (M1 et M2) (voir matériels et méthodes, point 2.2.2.2.). (**A**) Afin de marquer les compartiments acides dont les lysosomes, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente LysoTracker® red DND-99 (100 nM pendant 30 min). La morphologie du réseau mitochondrial est ensuite analysée sur les micrographies acquises au microscope confocal grâce au logiciel ImageJ selon deux paramètres : l'aspect ratio (AR) et l'end-point / branch-point ratio (EBR). (**B**) L'AR correspond au ratio entre la longueur et la largeur d'un fragment mitochondrial. Pour chaque cellule, la moyenne des AR de chaque fragment mitochondrial est calculée. (**C**) L'EBR correspond au ratio entre la somme des extrémités « end-points » et la somme des points de connexion « branch-points » de tous les fragments mitochondriaux d'une cellule analysée. Les résultats sont exprimés en moyennes ± 1 S.D. de la moyenne des AR (**B**) ou des EBR (**C**). Le nombre de cellules analysées provenant de deux expériences indépendantes est indiqué dans le coin inférieur gauche des micrographies.

(respectivement du 10 pg/ml LPS et 20 ng/ml d'IFNγ, ou 20 ng/ml d'IL-4 et 20 ng/ml d'IL-13). Au terme des incubations, les cellules ont été incubées avec la sonde MitoTracker® green (100 nM pendant 30 min) (Figure 3.8A.). Il est à noter que l'intensité émise par cette sonde fluorescente est indépendante du potentiel membranaire mitochondrial. La même approche a été utilisée avec la sonde LysoTracker® red DND-99 (100 nM durant 30 min). Cette sonde marque les compartiments acides dont les lysosomes (Figure 3.9A.). Les cellules vivantes ont ensuite été observées au microscope confocal.

La morphologie de la population mitochondriale a été analysée sur les micrographies acquises au microscope confocal avec des valeurs de PMT variables et ajustées afin de permettre la visualisation d'un réseau mitochondrial le plus net possible, et donc exploitable pour l'estimation quantitative de l'état connecté ou fragmenté des mitochondries grâce au logiciel ImageJ. Cette quantification a été réalisée selon deux paramètres : « l'aspect ratio (AR) » (Figure 3.8B.) et le « end-point/branch-point ratio (EBR) » (Figure 3.8C.) (voir Matériel et Méthodes, Figure 2.4.) Quel que soit le phénotype de macrophage polarisé, les résultats ne montrent aucune différence significative d'AR ou d'EBR n'est observée entre les cellules contrôles (macrophages polarisés non traités), les cellules incubées en présence de Revamil® ou les cellules exposées au « Sugar Mix ». Ajoutons que la morphologie mitochondriale ne semble pas différente entre les macrophages M0, M1 ou M2.

Dans les mêmes conditions, l'abondance des lysosomes et des compartiments acides a été analysée et quantifiée grâce au logiciel ImageJ selon un « ratio » calculé entre la surface occupée par le signal LysoTracker® red et la surface cellulaire (Figure 3.9B.) (voir Matériel et Méthodes, Figure 2.5.) De même que pour la morphologie mitochondriale, les résultats montrent que, quel que soit le phénotype de macrophage polarisé, les résultats ne montrent aucune différence significative dans la proportion occupée par le LysoTracker® red entre les cellules contrôles (macrophages polarisés non traités), les cellules incubées en présence de Revamil® ou les cellules exposées au « Sugar Mix ». Notons enfin que la morphologie lysosomale ne semble pas différente entre les macrophages M0, M1 ou M2.

Considérant l'absence d'effet du Revamil® sur ces paramètres de la biologie mitochondriale et lysosomale au cours de la polarisation des macrophages, nous avons décidé de passer à un modèle de stimulation des macrophages au LPS. L'objectif était de mimer une activation des macrophages par une stimulation par le LPS à une concentration de 100 ng/ml, concentration qui est bien plus élevée que la concentration utilisée pour la polarisation de macrophages M0 en macrophages M1 (10 ng/ml pour les RAW264.7 et 10 pg/ml pour les THP-1). Ainsi, les expériences suivantes seront réalisées sur des macrophages « naïfs » (non-stimulés au LPS), ou stimulés avec 100 ng/ml de LPS pendant des temps d'incubation allant de 2 h à 48 h, afin d'étudier un effet modulateur éventuel du Revamil® sur la biologie des mitochondries et des lysosomes dans un contexte pro-inflammatoire.

3.2. Analyse des effets potentiels du Revamil® sur la biologie des mitochondries et des lysosomes de macrophages stimulés ou non au LPS

La deuxième partie de ce mémoire fut consacrée à l'étude des effets potentiels du Revamil® sur la morphologie et l'abondance des mitochondries et sur l'abondance des lysosomes dans des macrophages « naïfs » ou stimulés avec 100 ng/ml de LPS. Différentes approches expérimentales (microscopie confocale, cytométrie de flux, analyse d'expression de gènes par western-blot) ont été utilisées afin de fournir une réponse la plus fiable possible.

3.2.1. Effets du Revamil® sur la morphologie mitochondriale des macrophages THP-1

De nombreuses études ont mis en évidence une augmentation de la fission mitochondriale de macrophages stimulés par des concentrations de LPS allant de 50 pg/ml à 1 µg/ml (Park *et al.*, 2013; Baker *et al.*, 2014). Afin d'étudier un effet modulateur éventuel du Revamil® sur la morphologie du réseau mitochondrial de macrophages « naïfs » ou stimulés par du LPS, des monocytes THP-1 ont été

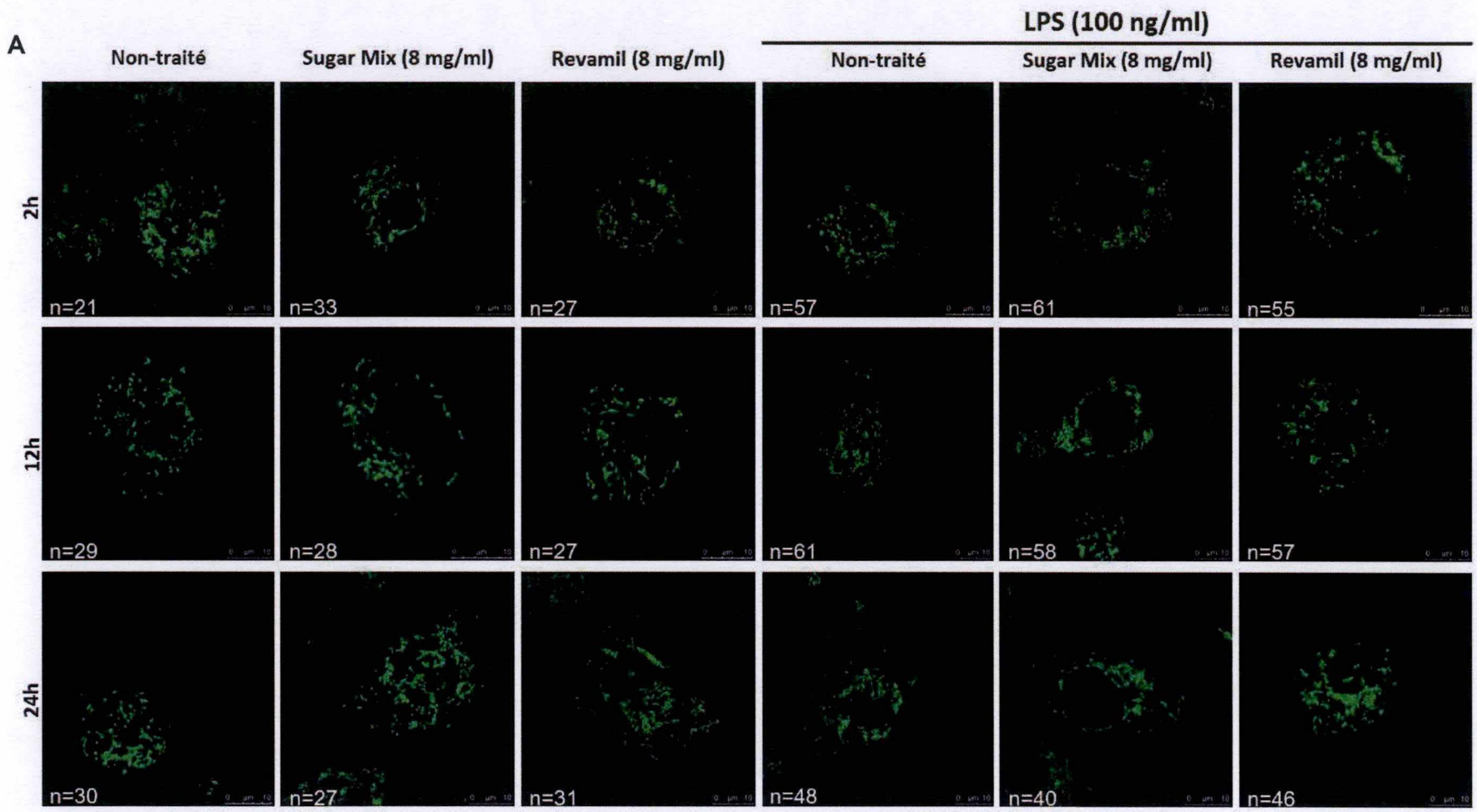


Figure 3.10. Effet du Revamil® sur la morphologie mitochondriale de macrophages THP-1 « naïfs » ou traités avec du LPS (100 ng/ml).

Légende et quantification de la morphologie mitochondriale à la page suivante.

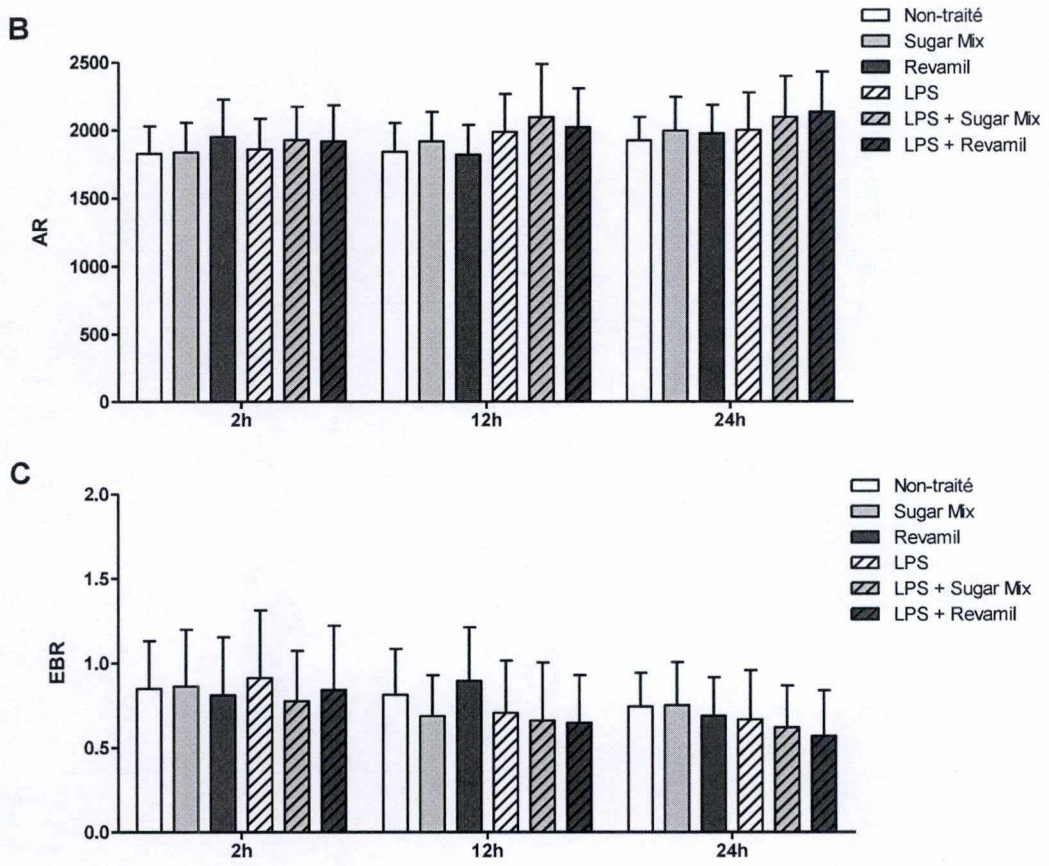


Figure 3.10. Effet du Revamil® sur la morphologie mitochondriale de macrophages THP-1 « naïfs » ou stimulés par du LPS (100 ng/ml) (suite).

Des monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages M0, puis ont été incubés en présence de milieu de culture RPMI + 10% de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar mix » et ce, en présence ou en absence de LPS (100 ng/ml) pendant 2, 12 et 24 h. (**A**) Afin de marquer le réseau mitochondrial, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente MitoTracker® green (100 nM pendant 30 min). La morphologie du réseau mitochondrial est analysée grâce au logiciel ImageJ selon deux paramètres : « l'aspect ratio » (AR) et « l'end-point / branch-point ratio » (EBR). (**B**) L'AR correspond au ratio entre la longueur et la largeur d'un fragment mitochondrial. Pour chaque cellule, la moyenne des AR de chaque fragment mitochondrial est calculée. (**C**) L'EBR correspond au ratio entre la somme des extrémités « end-points » et la somme des points de connexion « branch-points » de tous les fragments mitochondriaux d'une cellule analysée. Les résultats sont exprimés en moyennes ± 1 S.D. de la moyenne des AR (**B**) ou des EBR (**C**). Le nombre de cellules analysées provenant de deux expériences indépendantes est indiqué dans le coin inférieur gauche des micrographies.

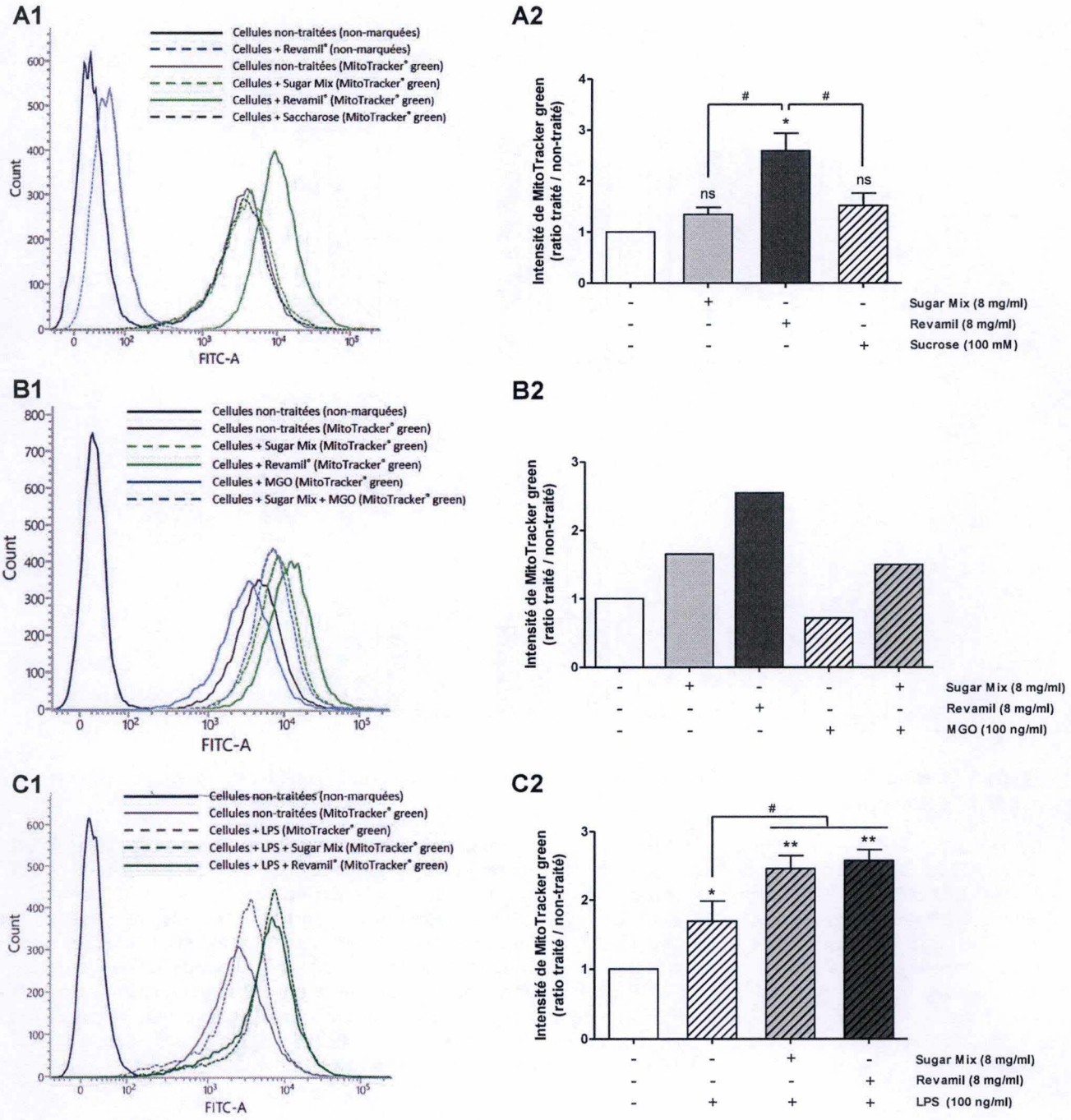


Figure 3.11. Effet du Revamil® sur l'intensité d'un marquage mitochondrial dans des macrophages RAW264.7 analysée par cytométrie de flux.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés, (**A**) en présence de milieu de culture DHG-L1 (+ 10 % de SIC) contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar mix » pendant 48 heures, (**B**) en présence de MGO (100 ng/ml – ajouté ou non au « Sugar mix ») pendant 48 heures, ou (**C**) en présence de LPS (100 ng/ml) pendant 24 h. Pour cette dernière condition, les cellules ont été pré-incubées pendant 24 h avec du Revamil® ou du « Sugar mix ». Pour marquer le réseau mitochondrial, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente MitoTracker® green (100 nM pendant 30 min). L'intensité du signal de fluorescence du MitoTracker® green a été mesurée et quantifiée par cytométrie de flux (sur 20 000 cellules analysées par condition) à l'aide du FACSVerse sur le canal FITC (500 – 550 nm). Les figures **A1**, **B1** et **C1** représentent des données brutes (histogrammes de fréquence) représentatives obtenues en cytométrie de flux. Les résultats **A2** et **C2** sont les résultats de quantification des intensités de fluorescence et représentent les moyennes relatives ± 1 S.D. de l'intensité du signal MitoTracker® green, comparées aux cellules contrôles non-traitées (colonne blanche) pour 3 expériences indépendantes (n=3). Les résultats **B2** sont exprimés comme l'intensité du signal de fluorescence du MitoTracker® green comparé au signal de cellules contrôles non-traitées (colonne blanche) (n=1).

différenciés en macrophages M0 par un traitement de 24 h en présence de PMA. Les cellules ont ensuite été incubées dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de de Revamil® ou de « Sugar Mix » en absence ou en présence de 100 ng/ml de LPS pendant 2, 12 ou 24 h. Au terme des incubations, les cellules ont été incubées avec la sonde MitoTracker® green (100 nM pendant 30 min) (Figure 3.10.). Les cellules vivantes ont ensuite été observées au microscope confocal. La morphologie de la population mitochondriale a été analysée sur les micrographies acquises au microscope confocal comme décrit précédemment. Quel que soit le temps d'incubation considéré, les résultats ne montrent aucune différence significative d'AR ou d'EBR entre les cellules incubées en présence de Revamil® et les cellules contrôles non traitées ou incubées en présence de « Sugar Mix » et ce, que les cellules soient stimulées ou non par le LPS. Notons toutefois que de manière inattendue si l'on se réfère à la littérature, nous avons observé qu'une stimulation au LPS ne semblait pas modifier la morphologie du réseau mitochondrial puisqu'aucune différence d'AR ni d'EBR n'était observée entre des cellules contrôles non traitées et des cellules incubées en présence de 100 ng/ml de LPS.

3.2.2. Effets du Revamil® sur l'abondance mitochondriale des macrophages RAW264.7

L'analyse des effets potentiels du Revamil® sur l'abondance des mitochondries de macrophages « naïfs » ou stimulés au LPS a été étudiée par deux approches : 1) une analyse de l'intensité du signal de fluorescence de la sonde MitoTracker® green en cytométrie de flux (aspect quantitatif) ou en microscopie confocale (aspect qualitatif) et, 2) l'analyse de l'abondance de marqueurs protéiques de la MME (TOM20 et VDAC) par western-blot en fluorescence. Pour nos analyses, un temps d'incubation des cellules de 48 h en présence de Revamil® ou de « Sugar Mix » a été choisi car ce temps correspond au temps d'incubation le plus élevé n'altérant pas la viabilité cellulaire (voir point 3.1.3.). Ajoutons cependant que la biogenèse mitochondriale dans des cellules monocytaires U937 stimulées par le NO peut nécessiter jusqu'à 6 jours (Nisoli *et al.*, 2004).

3.2.2.1. Analyse de l'abondance mitochondriale par cytométrie de flux

Des macrophages RAW264.7 ont été ensemencés dans des plaques de culture à 6-puits à une densité de 150 000 cellules/puits, puis pré-incubés avec du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix » pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été incubées dans ces mêmes milieux en absence ou en présence de 100 ng/ml de LPS pendant 24 h supplémentaires. Au terme des incubations, les cellules ont été incubées avec la sonde MitoTracker® green (100 nM pendant 30 min), puis préparées pour mesurer l'intensité du signal de fluorescence en cytométrie de flux (Figure 3.11.). Des cellules traitées au Revamil® mais non-marquées avec la sonde ont été utilisées comme contrôle négatif afin d'évaluer l'autofluorescence éventuelle des composés du Revamil® (Figure 3.11A1/A2). Dans ces conditions, nous observons que l'intensité du signal n'est pas beaucoup plus élevée que le signal d'autofluorescence obtenu avec les cellules non-traitées. De plus, les signaux de fluorescence de cellules non-marquées sont très faibles par rapport aux signaux de fluorescence de cellules marquées, démontrant que l'autofluorescence du Revamil® et des cellules est négligeable par rapport aux intensités de marquage.

En considérant tout d'abord les cellules « naïves » contrôles incubées en présence de Revamil® ou de « Sugar Mix » (Figure 3.11A2.), les résultats montrent que, de manière discriminante, le traitement au Revamil® induit une augmentation significative, d'un facteur 2,5, de l'intensité du signal MitoTracker® green, par rapport à l'intensité du signal de fluorescence pour des cellules contrôles, des cellules exposées au « Sugar Mix » ou encore des cellules incubées dans un milieu contenant 100 mM de saccharose, utilisé comme contrôle visant à mimer l'accumulation endocytaire du saccharose présent dans le Revamil® ou le « Sugar mix » dans les lysosomes. Ces résultats suggèrent qu'un ou plusieurs composés contenus dans le Revamil® sont capables d'induire une augmentation du signal MitoTracker® green dans les macrophages RAW264.7. Afin de tester l'effet d'un acteur potentiellement responsable de cet effet, des RAW264.7 ont également été incubées dans du milieu de

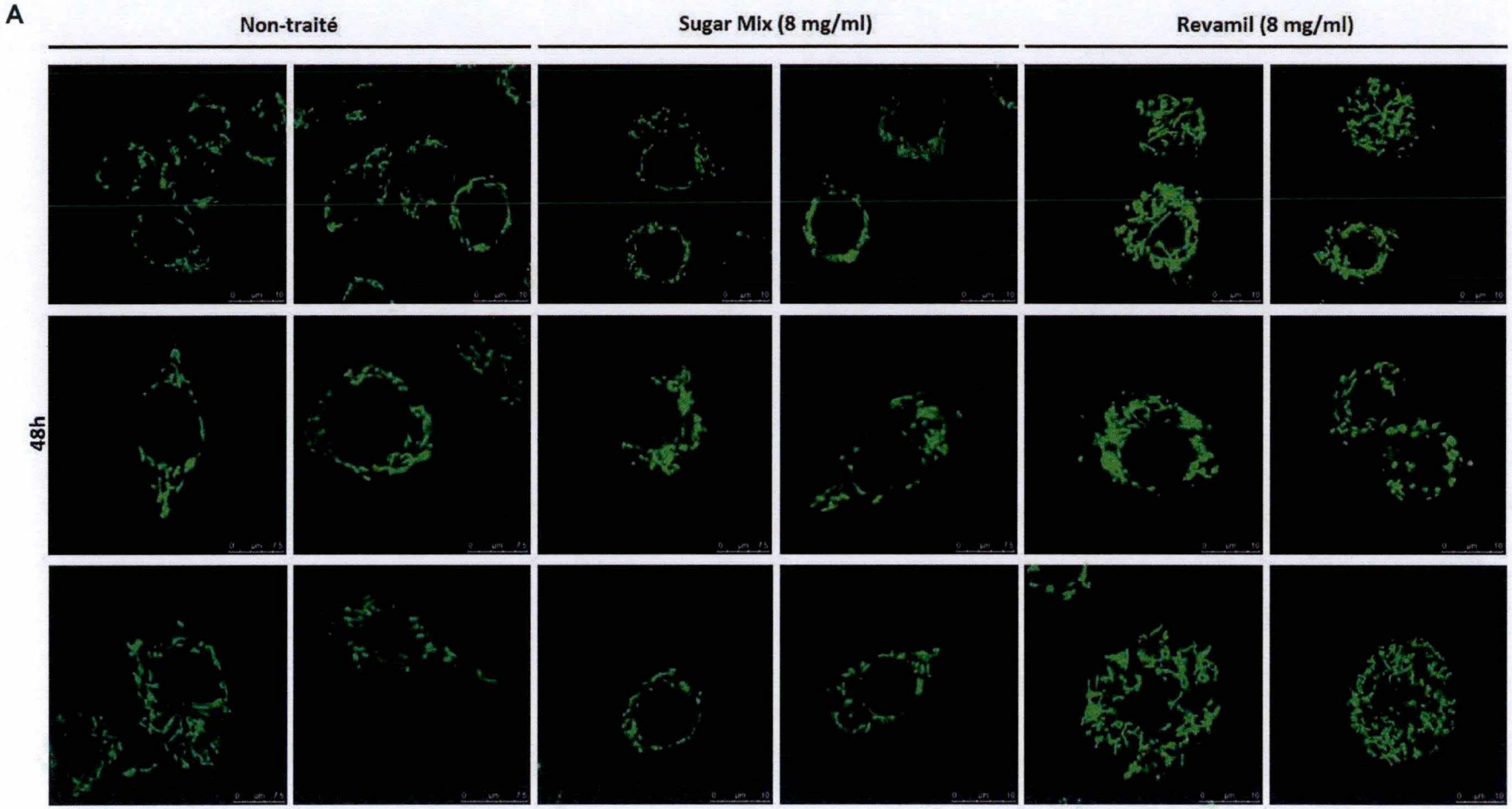


Figure 3.12. Effet du Revamil® sur l'intensité d'un marquage mitochondrial dans des macrophages RAW264.7 analysée en microscopie confocale.

Légende et contrôle négatif à la page suivante.

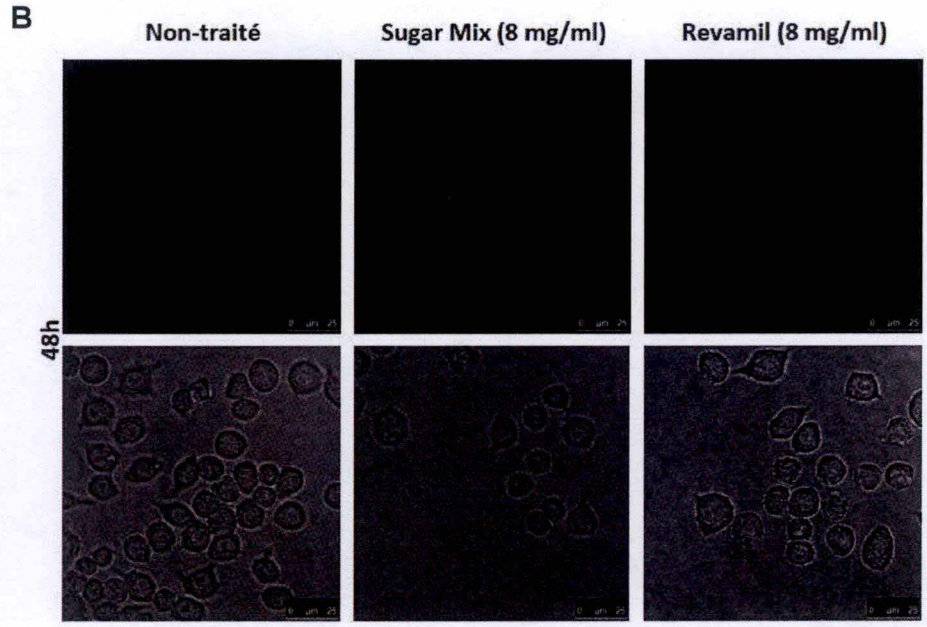


Figure 3.12. Effet du Revamil® sur l'intensité d'un marquage mitochondrial dans des macrophages RAW264.7 analysée en microscopie confocale (suite).

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés dans du milieu de culture DHG-L1+ 10 % de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar mix » pendant 48 h. Pour marquer le réseau mitochondrial, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente MitoTracker® green (100 nM durant 30 min) et (**A**) les cellules ont été observées en microscopie confocale. Pour chaque condition, 6 micrographies représentatives sont présentées. (**B**) Afin de vérifier l'absence d'auto-fluorescence du Revamil®, un contrôle négatif a été réalisé avec des cellules incubées en présence de Revamil® ou de « Sugar mix » mais non-marquées avec le MitoTracker® green. Toutes les micrographies ont été acquises à un PMT fixé à 772.

culture contenant 100 ng/ml de méthylglyoxal (MGO), une concentration comparable à celle présente dans le Revamil® (Le Bihan, 2016) et ce, en présence ou en absence de 8 mg/ml de « Sugar Mix » pendant 48 h (Figure 3.11B1/B2.). Les résultats montrent que les intensités des signaux de fluorescence pour les cellules traitées avec 100 ng/ml de MGO en présence ou en absence de « Sugar Mix » sont respectivement comparables aux signaux de fluorescence obtenus pour des cellules non-traitées/contrôles ou incubées en présence de « Sugar Mix ». Bien que ces résultats ne proviennent que d'une expérience préliminaire, ils suggèrent que le MGO présent dans le miel n'est pas responsable à lui seul de l'augmentation du signal de fluorescence du MitoTracker® green observé dans les cellules incubées en présence de Revamil®.

En considérant ensuite les cellules incubées avec le Revamil® ou le « Sugar Mix » en présence de 100 ng/ml de LPS (Figure 3.11C1/C2.), lles signaux de fluorescence ne montrent aucune différence significative entre des cellules incubées en présence de Revamil® ou de « Sugar Mix » même si une différence significative est observée lorsque l'on compare ces signaux aux signaux de fluorescence obtenus pour des cellules contrôles non-traitées ou des cellules stimulées par le LPS uniquement. Néanmoins, ces résultats suggèrent que les effets observés avec le Revamil® sont probablement dus à la composition en sucres du miel et non à des composants spécifiques du miel.

Vu l'absence d'effet modulateur du Revamil® sur l'abondance des mitochondries de macrophages stimulés au LPS, nous avons décidé, dans la suite de ce travail, de ne plus travailler avec le LPS et de nous focaliser uniquement des macrophages « naïfs » incubés en présence de Révamil® ou de « Sugar Mix ».

3.2.2.2. Analyse de l'abondance mitochondriale en microscopie confocale

Afin de tenter de confirmer les résultats obtenus en cytométrie de flux, des macrophages RAW264.7 ont été incubés dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix » pendant 48 h, puis marqués avec la sonde fluorescente MitoTracker® green (100 nM pendant 30 min) afin d'observer la population mitochondriale au microscope confocal (Figure 3.12A.). Des cellules incubées en présence des sucres ou de miel mais non-marquées avec la sonde fluorescente ont également été utilisées comme contrôle négatif afin de tester l'autofluorescence éventuelle du Revamil® (Figure 3.12B.). Afin de pouvoir comparer les intensités de signal de MitoTracker® green, les micrographies ont été acquises à un même PMT fixé à 772 et ce contrairement aux expériences réalisées dans le but d'analyser la morphologie mitochondriale. Dans ces conditions, le Revamil® ne montre pas d'autofluorescence et semble provoquer, de manière discriminante, une augmentation de l'intensité du signal MitoTracker® green comparé aux cellules traitées avec le « Sugar Mix » et aux cellules contrôles non-traitées.

Les résultats obtenus en cytométrie de flux et en microscopie confocale permettent d'émettre l'hypothèse qu'une incubation des macrophages RAW264.7 en présence de Revamil® pendant 48 h augmenterait l'abondance mitochondriale. Cependant, nous avons été intrigués par ces résultats car le temps d'incubation semble très court par rapport au temps nécessaire pour observer une biogenèse de l'organite dans des cellules monocytaires U937 stimulées par le NO (plus de 5 jours) (Nisoli et al., 2004).

Cependant, si dans des macrophages exposés au Revamil® l'hypothèse d'une augmentation de la population mitochondriale dans des cellules exposées au miel résultant d'une augmentation de la biogenèse de l'organite est correcte, l'abondance de protéines mitochondriales devrait également être modifiée et augmentée.

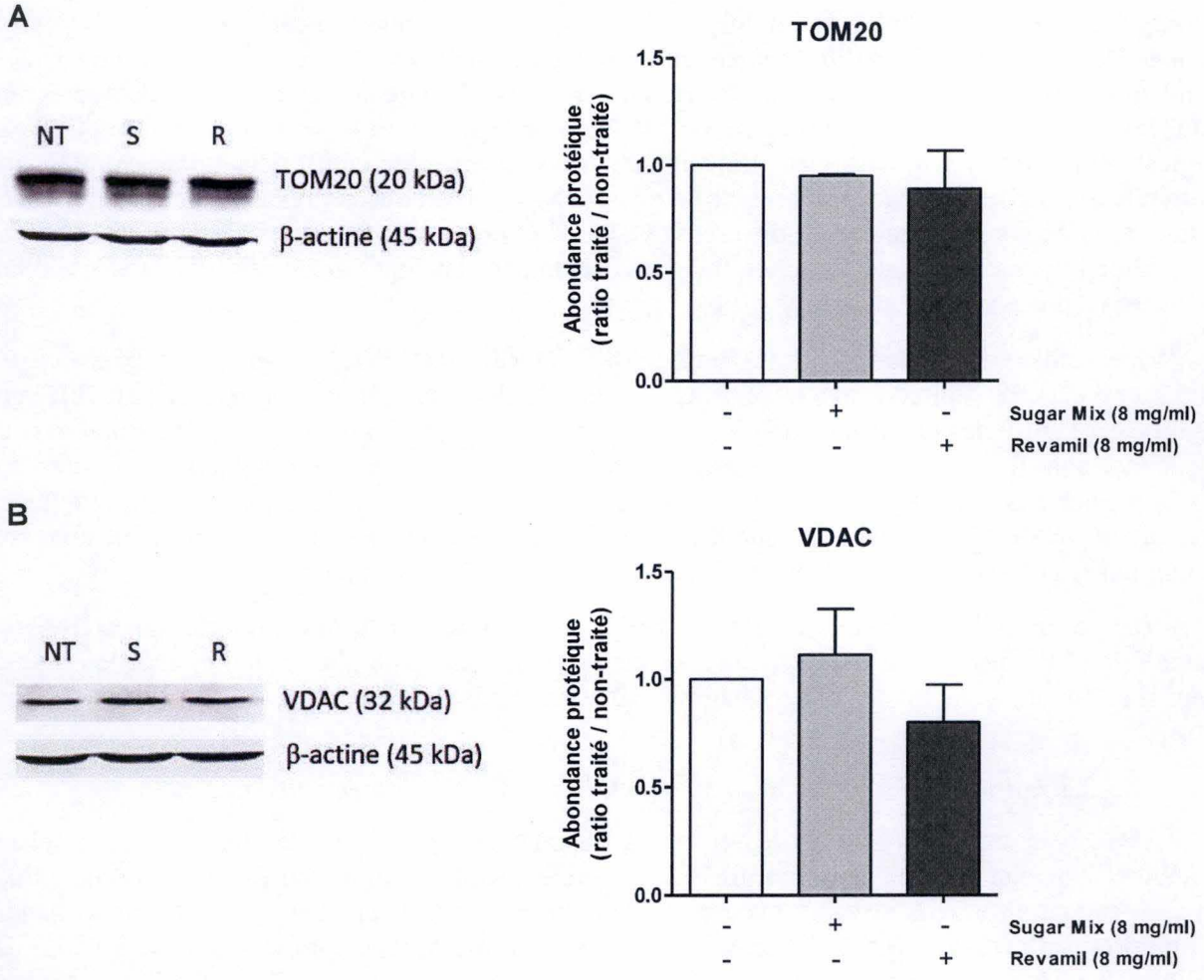


Figure 3.13. Effet du Revamil® (48 h d'incubation) sur l'abondance de TOM20 et de VDAC.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés pendant 48 h dans du milieu de culture DHG-L1+ 10% de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® (R) ou de « Sugar mix » (S). Après préparation de lysats cellulaires, les abondances des protéines mitochondriales TOM20 (20 kDa) (**A**) et VDAC (32 kDa) (**B**) ont été analysées par western blot en fluorescence. Les abondances protéiques ont ensuite été quantifiées et normalisées par rapport à l'abondance de la β-actine (45 kDa) utilisée comme contrôle de charge. Dans les graphiques de droite, les résultats sont exprimés en abondance protéique relative comparée à l'abondance retrouvée dans des cellules contrôles non-traitées (NT) (colonne blanche) et représentent la moyenne ± 1 S.D. pour trois réplicats biologiques indépendants (n=3).

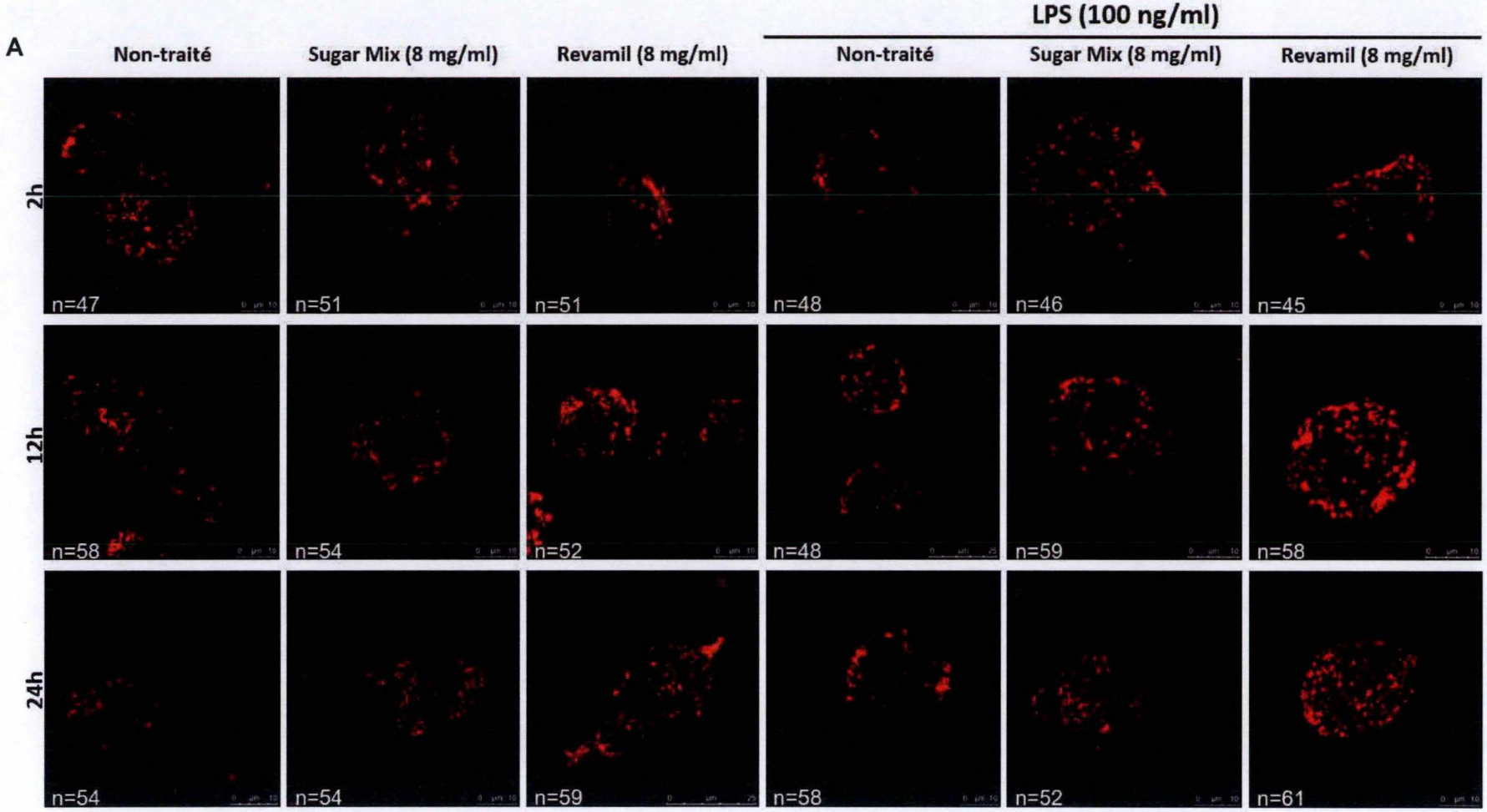


Figure 3.14. Effet du Revamil® sur la surface des compartiments acides occupée dans des macrophages THP-1 « naïfs » ou stimulés avec du LPS (100 ng/ml).

Légende et quantification de la surface occupée par les compartiments acides à la page suivante.

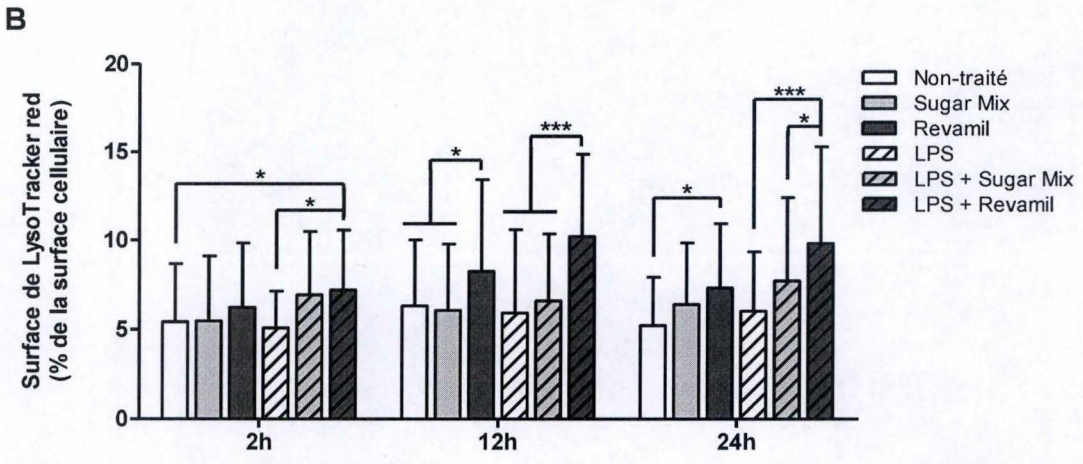


Figure 3.14. Effet du Revamil® sur la surface des compartiments acides occupée dans des macrophages THP-1 « naïfs » ou stimulés avec du LPS (100 ng/ml) (suite).

Des monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages M0 avant d'être incubés pendant 2, 12 ou 24 h dans du milieu de culture RPMI + 10% de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar mix », en présence ou en absence de LPS (100 ng/ml) . Afin de marquer les compartiments acides, les cellules ont ensuite été incubées avec la sonde fluorescente LysoTracker® red DND-99 (100 nM pendant 30 min), utilisée à une concentration (**A**). La surface occupée par les compartiments acides a été analysée et quantifiée grâce au logiciel ImageJ (voir Matériels et Méthodes, Figure 2.5.). Les résultats sont exprimés comme la proportion de la surface cellulaire occupée par les structures subcellulaires marquées et représentent les moyennes ± 1 S.D. pour le nombre de cellules analysées indiqué dans le coin inférieur gauche des micrographies et obtenues dans deux expériences indépendantes.

3.2.2.3. Analyse de l'abondance des protéines mitochondriales TOM20 et VDAC

Afin de vérifier si l'effet du Revamil® sur l'intensité du signal de MitoTracker® green observé peut être relié ou non à une augmentation de l'abondance de protéines mitochondriales, des macrophages RAW264.7 ont été incubés en présence de milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix » pendant 48 h. Les abondances des protéines TOM20 et VDAC, deux protéines de la MME, communément utilisées comme marqueurs protéiques de l'abondance mitochondriale (Michel *et al.*, 2011), ont été analysées par western-blot en fluorescence à partir de 15 µg de protéines de lysats cellulaires (Figure 3.13.). Les abondances des deux marqueurs ont été normalisées par rapport à l'abondance de la β-actine, dont l'immuno-détection est utilisée comme contrôle de charge. De manière inattendue, les résultats montrent que ni l'abondance de TOM20, ni l'abondance de VDAC n'est augmentée dans les cellules incubées en présence de Revamil®, par rapport à l'abondance retrouvée dans des cellules contrôles non-traitées ou des cellules incubées en présence de « Sugar Mix ». Ces résultats contrastent avec les résultats obtenus en cytométrie de flux et en microscopie confocale et ne supportent donc pas l'hypothèse d'une augmentation de la biogenèse des mitochondries dans les cellules incubées en présence de miel.

3.2.3. Effets du Revamil® sur l'abondance lysosomale des macrophages THP-1 et RAW264.7

Nous nous sommes alors intéressés aux effets potentiels du Revamil® sur l'abondance des lysosomes de macrophages contrôles « naïfs » ou stimulés au LPS. L'abondance de cet organite a été étudié par deux approches : 1) l'analyse de l'intensité du signal de la sonde fluorescente LysoTracker® red DND-99 en cytométrie de flux ou en microscopie confocale par l'analyse de la surface occupée par les lysosomes, et 2) l'étude de l'abondance de LAMP-1, un marqueur protéique de la membrane du lysosome, par des analyses en western blot en fluorescence. Pour ces analyses, des temps d'incubation des cellules de 2, 12, 24 et 48 h en présence de Revamil® ou de « Sugar Mix » ont été choisis.

3.2.3.1. Analyse de l'abondance lysosomale dans des macrophages THP-1 par microscopie confocale

Afin d'étudier une effet modulateur potentiel du Revamil® sur l'abondance des lysosomes de macrophages contrôles « naïfs » ou stimulés par du LPS, des monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages M0, puis ont été incubés pendant 2, 12 ou 24 h dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil®, ou de « Sugar Mix » en présence ou non de 100 ng/ml de LPS. Au terme des incubations, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente LysoTracker® red DND-99 (100 nM durant 30 min) (Figure 3.14A.) et ensuite observées au microscope confocal. L'abondance des lysosomes a été analysée à partir de micrographies des cellules à l'aide du logiciel ImageJ en analysant la surface occupée par le signal de fluorescence associée au LysoTracker® red, surface qui est ensuite comparée à la surface de la cellule (Figure 3.14B.) (voir Matériel et Méthode, Figure 2.5.).

En considérant tout d'abord les cellules « naïves » incubées en présence de Revamil® ou de « Sugar Mix », les résultats montrent que la surface relative occupée par les organites marqués par le LysoTracker® red est significativement plus importante en réponse au traitement par le Revamil® que la surface occupée par des cellules contrôles (non-traitées ou exposées au « Sugar mix ») et ce, pour 12 ou 24 h d'incubation. Concernant les cellules traitées avec le Revamil® ou le « Sugar Mix » en présence de LPS, les résultats montrent que la surface relative occupée par les organites marqués par le LysoTracker® red est significativement plus importante suite au traitement par le Revamil® comparé à la surface occupée dans les cellules stimulées au LPS ou exposées au LPS en présence de « Sugar mix », et ce, pour 2, 12 et 24 h d'incubation. Notons que les effets observés sont uniquement observés pour les cellules incubées en présence de Revamil® après 12 h d'incubation, et que ces différences (par rapport au « Sugar mix ») semblent moins fortes après 24 h.

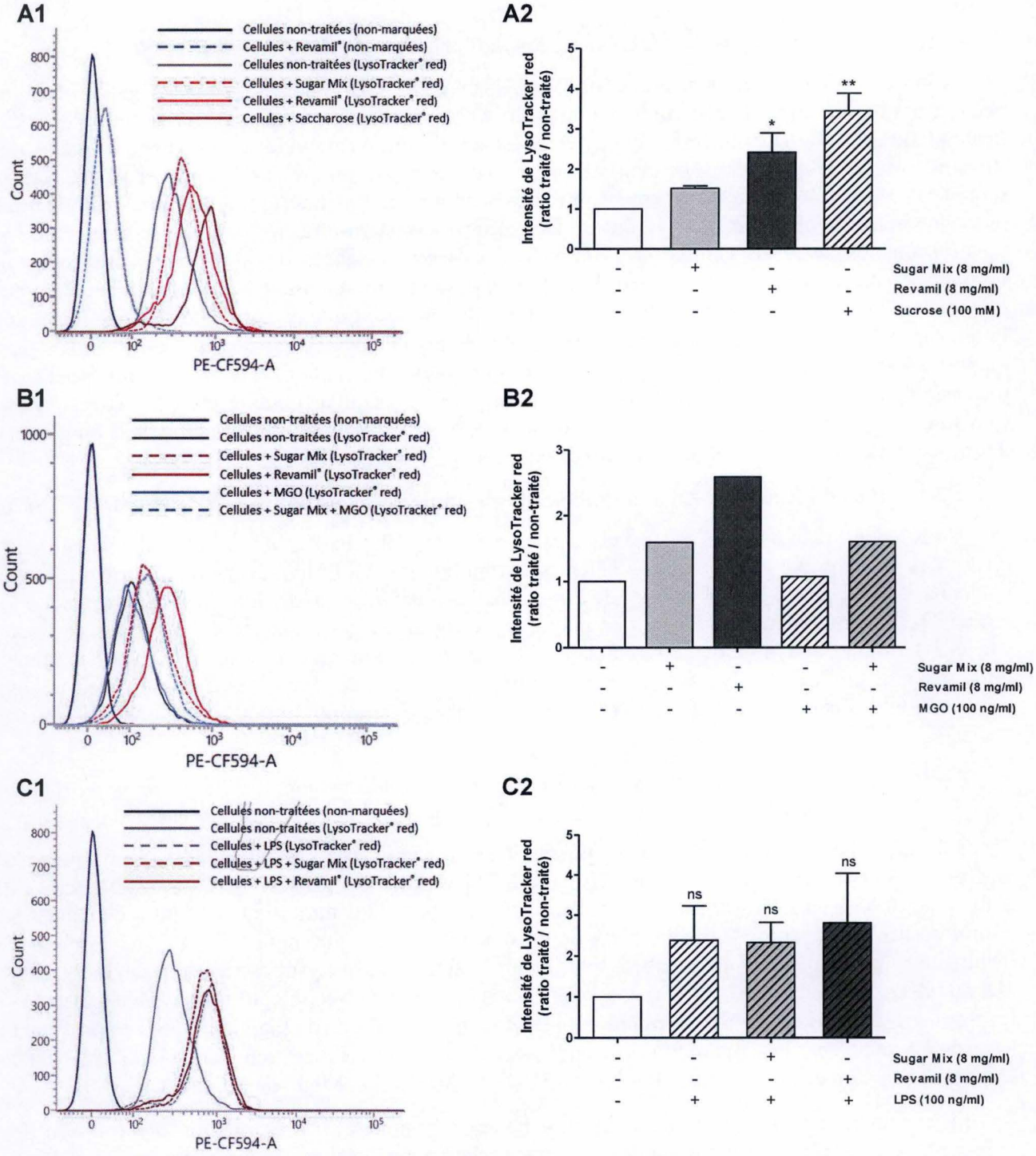


Figure 3.15. Effet du Revamil® sur l'abondance lysosomale de macrophages RAW264.7 par cytométrie de flux.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés, (**A**) en présence de milieu de culture DHG-L1 (+ 10 % de SIC) contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar mix » pendant 48 heures, (**B**) en présence de MGO (100 ng/ml – ajouté ou non au « Sugar mix ») pendant 48 heures, ou (**C**) en présence de LPS (100 ng/ml) pendant 24 h. Pour cette dernière condition, les cellules ont été pré-incubées pendant 24 h avec du Revamil® ou du « Sugar mix ». Pour marquer les compartiemnts acides dont les lysosomes, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente LysoTracker® red DND-99 (100 nM pendant 30 min). L'intensité du signal de fluorescence du LysoTracker® red a été mesurée et quantifiée par cytométrie de flux (sur 20 000 cellules analysées par condition) à l'aide du FACSVerse sur le canal PE-CF594 (575 – 610 nm). Les figures **A1**, **B1** et **C1** représentent des données brutes (histogrammes de fréquence) représentatives obtenues en cytométrie de flux. Les résultats **A2** et **C2** sont les résultats de quantification des intensités de fluorescence et représentent les moyennes relatives ± 1 S.D. de l'intensité du signal LysoTracker® red, comparées aux cellules contrôles non-traitées (colonne blanche) pour 3 expériences indépendantes (n=3). Les résultats **B2** sont exprimés comme l'intensité du signal de fluorescence du LysoTracker® red comparé au signal de cellules contrôles non-traitées (colonne blanche) (n=1).

3.2.3.2. Analyse de l'abondance lysosomale dans des macrophages RAW264.7 par cytométrie de flux

Afin d'analyser les effets potentiels du Revamil® sur l'abondance des lysosomes pour des temps d'incubation plus longs (48 h d'incubation), des macrophages RAW264.7 ont été pré-incubés dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix » pendant 24 h, puis incubés dans ces milieux en présence ou en absence de 100 ng/ml de LPS pendant 24 h supplémentaires. Au terme des incubations, les cellules ont été incubées avec la sonde fluorescente LysoTracker® red DND-99 (100 nM pendant 30 min), puis préparées afin d'étudier l'intensité du signal de fluorescence en cytométrie de flux (Figure 3.15.). Des cellules traitées au Revamil® mais non-marquées avec la sonde ont été utilisées comme contrôle négatif afin d'évaluer l'autofluorescence des composés du Revamil® (Figure 3.15A1). Dans ces conditions, on observe que l'intensité du signal est légèrement supérieure au signal d'autofluorescence de cellules contrôles non-traitées et que l'autofluorescence est très faible comparée aux signaux de fluorescence obtenus pour des cellules marquées avec la sonde. Ces résultats montrent que l'autofluorescence du Revamil® est négligeable dans nos conditions d'analyse.

En considérant tout d'abord les cellules contrôles incubées dans du milieu de culture contenant le Revamil® ou le « Sugar Mix » (Figure 3.15A2.), les résultats montrent que le traitement au Revamil® induit une augmentation significative, d'un facteur 2,5, de l'intensité du signal de fluorescence du LysoTracker® red, lorsqu'il est comparé aux signaux de fluorescence obtenus pour des cellules contrôles non traitées ou des cellules exposées au « Sugar Mix ». Des cellules traitées avec une solution de 100 mM de saccharose ont également été utilisée comme contrôle positif sachant que ce type de traitement induit une surcharge lysosomale (Jadot *et al.*, 1985). Ces résultats suggèrent qu'un (ou plusieurs) composé(s) autre(s) que les sucres, présent(s) dans le Revamil® est (sont) responsables de l'augmentation observée du signal de fluorescence associé au LysoTracker® red. Afin de tester l'effet d'un acteur potentiellement responsable de cet effet, des macrophages RAW264.7 ont été incubés pendant 48 h en présence de milieu contenant 100 ng/ml de MGO, une concentration comparable à celle présente dans le Revamil® (Le Bihan, 2016) et ce, en présence ou en absence de 8 mg/ml de « Sugar Mix », (Figure 3.15B.). Les résultats montrent que l'intensité du signal de fluorescence observé dans les cellules traitées avec le MGO est comparable au signal de fluorescence de cellules contrôles non-traitées ou incubées en présence de « Sugar Mix ». Ces résultats suggèrent que le MGO n'est pas à lui seul responsable de l'augmentation du signal du LysoTracker® red que nous observons suite au traitement des cellules avec le Revamil®.

En considérant maintenant les cellules incubées dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix » en présence ou en absence de 100 ng/ml de LPS (Figure 3.15C2.), les résultats montrent qu'aucune différence significative d'intensité de signal fluorescent n'est observée et ce, quel que soit le traitement envisagé.

Vu l'absence d'effet modulateur du Revamil® sur l'intensité de fluorescence de la sonde marquant les compartiments acides dans des macrophages stimulés au LPS, nous avons décidé, dans la suite de ce travail, de nous focaliser sur le modèle de macrophages « naïfs » traités au Revamil® ou au « Sugar Mix ».

3.2.3.3. Analyse de l'abondance de la protéine lysosomale LAMP-1 dans des macrophages RAW264.7

Afin de rechercher si l'effet du Revamil® dans les macrophages sur l'augmentation de l'intensité du signal de LysoTracker® red observée en cytométrie de flux (et sur l'augmentation de la surface relative occupée par le signal de fluorescence du LysoTracker® red observés en microscopie confocale pour des temps plus courts) est corrélée ou non à une augmentation de l'abondance des protéines lysosomales, des macrophages RAW264.7 ont été traités dans les mêmes conditions avec du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix » pendant 2, 12, 24 (en présence ou non de

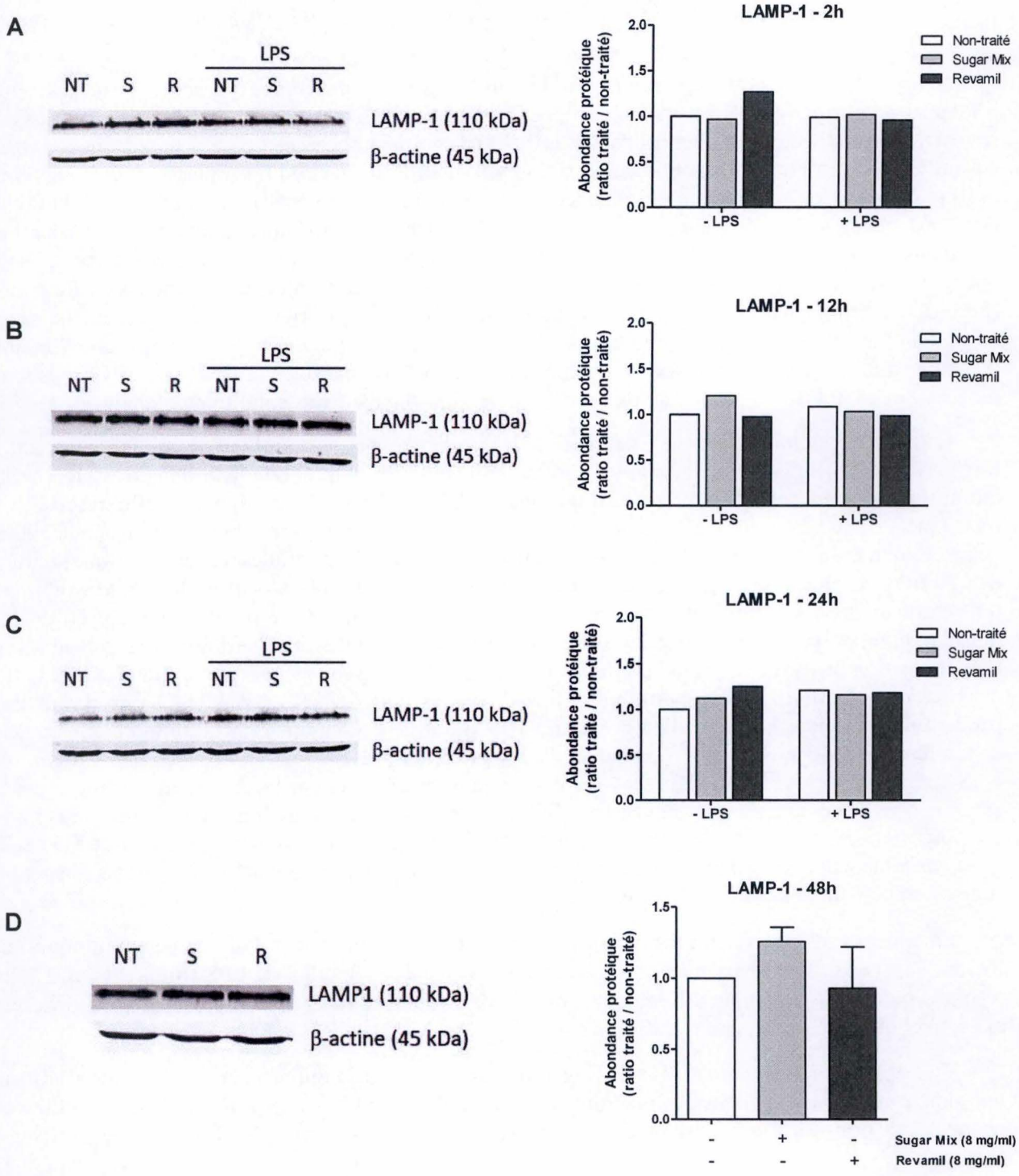


Figure 3.16. Effet du Revamil® sur l'abondance de LAMP-1 dans des macrophages RAW264.7.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés pendant (**A**) 2, (**B**) 12, (**C**) 24 et (**D**) 48 h en présence de milieu de culture DHG-L1 + 10 % de SIC contenant 8 mg/ml Revamil® (R) ou de « Sugar mix » (S) en présence ou en absence de LPS (100 ng/ml). Après préparation de lystas cellulaires, l'abondance de la protéine lysosomale LAMP-1 (110 kDa) a été analysée par western blot en fluorescence. L'abondance protéique a ensuite été quantifiée et normalisée par rapport à l'abondance de la β-actine (45 kDa) utilisée comme contrôle de charge. Dans le graphique de droite, les résultats sont exprimés en abondance protéique relative comparée à l'abondance de LAMP-1 retrouvée dans des cellules contrôles non-traitées (NT) (colonne blanche) et représentent la moyenne pour trois réplicats biologiques indépendants (n=3).

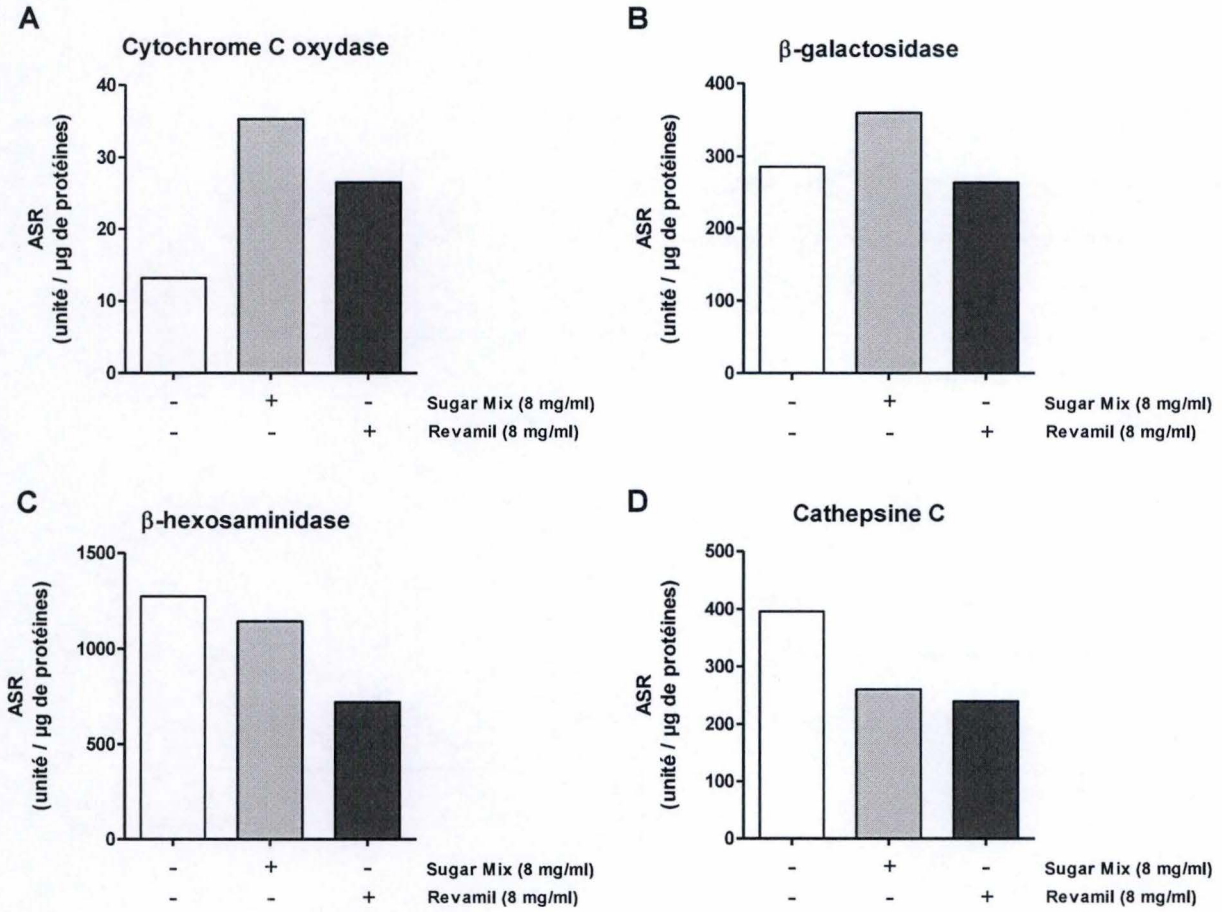


Figure 3.17. Effet du Revamil® sur l'activité d'enzymes mitochondriale et lysosomales

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés pendant 48 h dans du milieu de culture DHG-L1 + 10 % de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar mix ». Arès préparation des lysats cellulaires, les activités enzymatiques de la Cytochrome C oxydase (**A**), de la β-galactosidase (**B**), de la β-hexosaminidase (**C**) et de la cathepsine C (**D**) ont été mesurées par des dosages fluorimétriques. Les résultats sont exprimés en unités d'activité spécifique relative (ASR) de l'enzyme comparées aux valeurs obtenus pour des cellules non-traitées utilisées comme cellules contrôles (colonne blanche) (n=1).

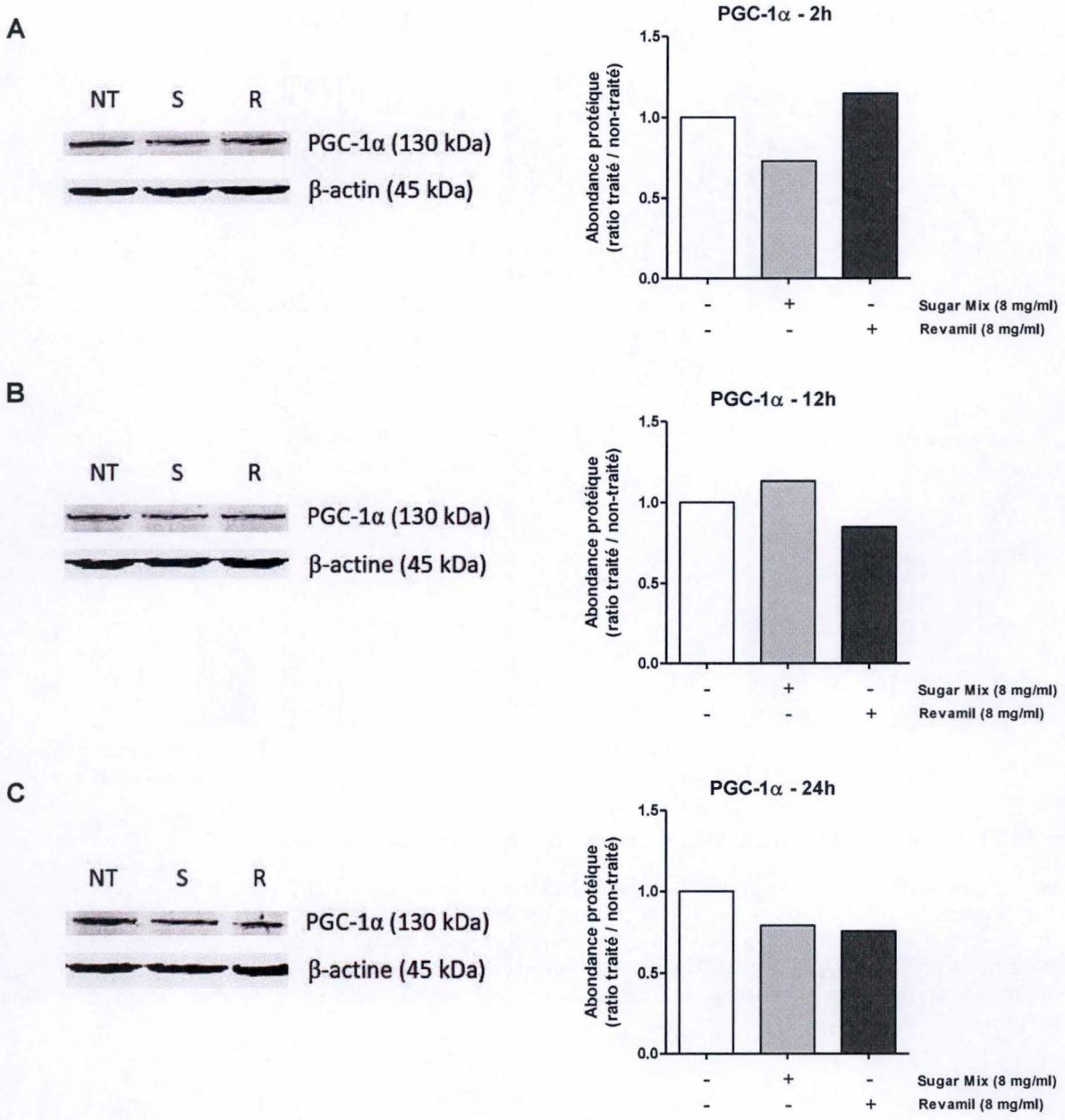


Figure 3.18. Effet du Revamil® sur l'abondance de PGC-1α.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés dans du milieu de culture DHG-L1 + 10 % de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® (R) ou de « Sugar mix » (S) pendant (**A**) 2, (**B**) 12 ou(**C**) 24 heures. Arès préparation des lysats cellulaires, l'abondance de PGC-1α (130 kDa) a été analysée par western blot en fluorescence. L'abondance protéique a ensuite été quantifiée et normalisée par rapport à l'abondance de la β-actine (45 kDa) utilisée comme contrôle de charge. Dans les graphiques, les résultats sont exprimés comme l'abondance protéique comparée aux cellules non-traitées (NT) utilisées comme contrôles (colonne blanche) et représentent les moyennes pour 2 réplicats biologiques indépendants (n=2).

100 ng/ml de LPS) et 48 h. Au terme des incubations, des lysats cellulaires ont été préparés et utilisés pour mesurer l'abondance de la protéine LAMP-1 a été analysée par western blot à partir de 15 µg de protéines de lysats cellulaires (Figure 3.16.). L'abondance de LAMP-1 a été normalisée par rapport à l'abondance de la β-actine, dont l'immuno-détection est utilisée comme contrôle de charge. Quel que soit le traitement considéré, les résultats ne mettent en évidence aucune différence d'abondance de LAMP-1. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus en cytométrie de flux et suggèrent que l'abondance des lysosomes n'est pas modifiée et certainement pas augmentée dans les cellules incubées en présence de Revamil®.

3.2.4. Effets du Revamil® sur l'activité d'enzymes mitochondriale et lysosomales

Enfin, en complément des mesures d'abondances protéiques décrites ci-dessus, nous avons voulu tester les effets potentiels du Revamil® sur l'activité d'enzymes mitochondriales (cytochrome C oxydase) et lysosomales (β-galactosidase, β-hexosaminidase et cathepsine C) (Figure 3.17.). Pour ce faire, des macrophages RAW264.7 ont été incubés dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml Revamil® ou de « Sugar Mix » pendant 48 h. Bien qu'il faille être très prudent dans l'interprétation de ces résultats préliminaires, ils semblent indiquer qu'un traitement des cellules avec le Revamil® ou avec le « Sugar Mix » induit une augmentation de l'activité de la cytochrome C oxydase, avec un effet moins prononcé pour le Revamil® que pour le milieu contenant le « Sugar Mix ». Pour ce qui concerne les enzymes lysosomales, l'activité de la β-galactosidase ne semble pas être modifiée quel que soit le traitement envisagé, et les activités de la β-hexosaminidase et de la cathepsine C semblent être diminuées dans les cellules en réponse à une incubation en présence de Revamil® ou de « Sugar Mix ». Il est intéressant de noter que ces données confirment nos conclusions, à savoir que l'abondance des lysosomes n'est pas augmentée dans les cellules incubées en présence de miel.

3.3. Analyse des effets potentiels du Revamil® sur les majeures voies de signalisation impliquées dans la biologie des mitochondries et des lysosomes

Dans les cellules incubées en présence de miel, nous avons observé des signaux de fluorescence plus élevés pour les sondes fluorescentes MitoTracker® green et le LysoTracker® red, sondes couramment utilisées pour mettre respectivement en évidence l'abondance de mitochondries ou de lysosomes dans les cellules (Wilson-fritch *et al.*, 2003; Godar *et al.*, 2012). Cependant, comme nous l'avons vu plus haut, ces données ne sont pas corrélées à des changements d'abondance de protéines marqueurs de ces organites, ni pour la mitochondrie ni pour le lysosome. Dans la dernière partie de ce mémoire, nous nous sommes donc intéressés aux effets potentiels du Revamil® sur les voies de signalisation et mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la biogenèse des mitochondries et des lysosomes.

3.3.1. Effets du Revamil® sur l'abondance de PGC-1α dans des macrophages RAW264.7

Afin d'approfondir l'étude de l'effet potentiel du Revamil® sur l'abondance des mitochondries (voir point 3.2.2.), nous avons mesuré l'abondance protéique du co-activateur transcriptionnel PGC-1α, régulateur clé dans l'activation de la biogenèse mitochondriale (Ventura-Clapier *et al.*, 2008; Wenz, 2013). Ces tests ont été réalisés par western blot à partir de 15 µg de protéines de lysats cellulaires préparés à partir de macrophages RAW264.7 incubés dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix » pendant 2, 12 ou 24 h (Figure 3.18.). L'abondance de PGC-1α a été normalisée par rapport à l'abondance de la β-actine, dont l'immuno-détection est utilisée comme contrôle de charge. Les résultats montrent que, quel que soit le traitement ou le temps d'incubation considéré, aucune différence d'abondance de PGC-1 α n'est observée. Ces résultats suggèrent que le Revamil® n'induit pas d'activation de la biogenèse mitochondriale dépendante de PGC-1 α. Ces résultats sont en accord avec les analyses d'abondance des protéines TOM20 et VDAC (voir points 3.2.2.1. et 3.2.2.2.)

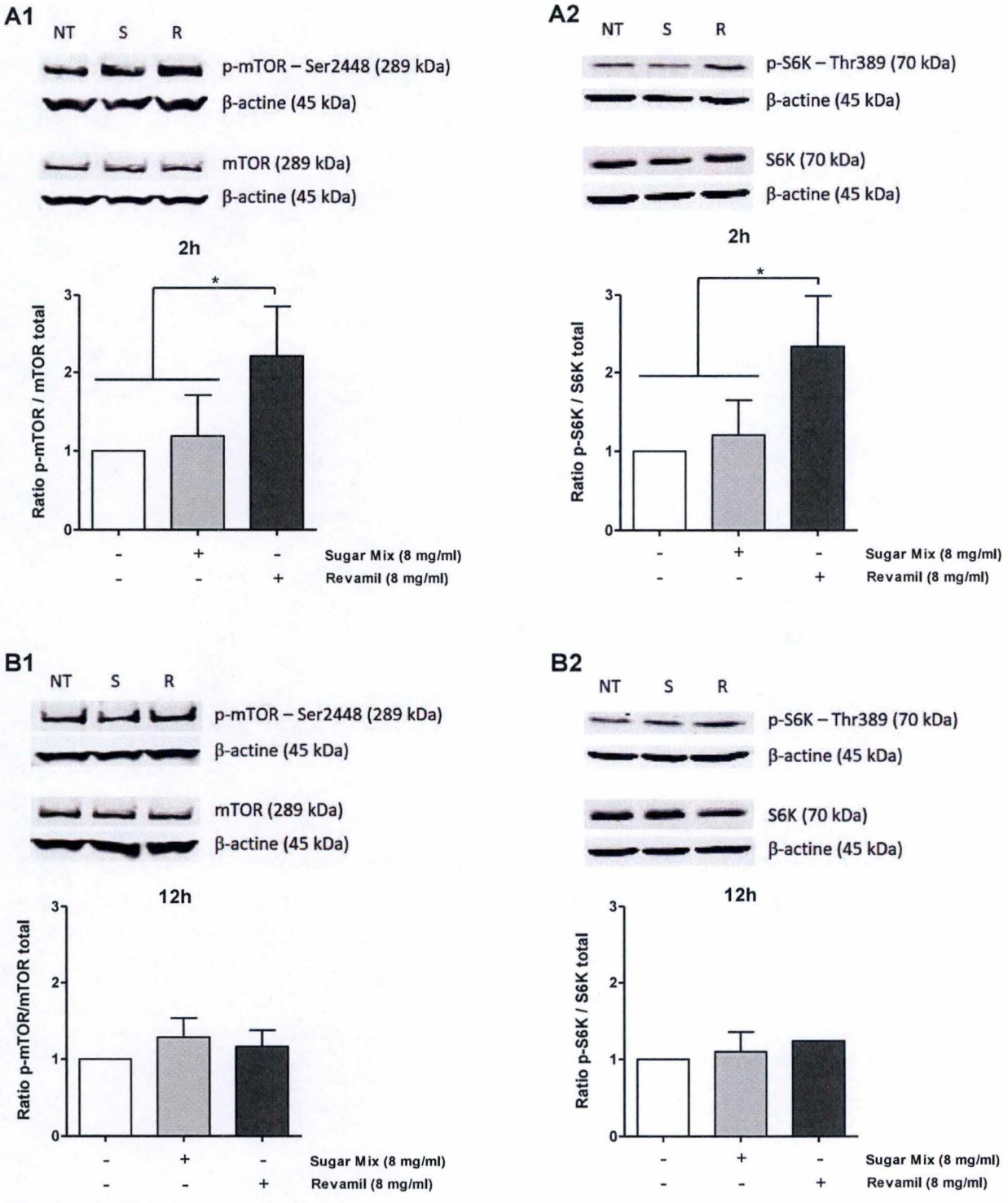


Figure 3.19. Effet du Revamil® sur la phosphorylation et l'activation de mTOR et de S6K.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés dans du milieu de culture DHG-L1+ 10 % de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® (R) ou de « Sugar mix » (S) pendant (**A**) 2 ou (**B**)12 heures. Arès préparation des lysats cellulaires, les abondances de p-mTOR (forme active) et de mTOR (forme totale) (**A1** et **B1**), ainsi que de p-S6K (forme active) et de S6K (forme totale) (**A2** et **B2**) ont été analysées par western blot en fluorescence. Les abondances protéiques des formes phosphorylées et totales ont ensuite été quantifiées et normalisées par rapport à l'abondance de la β-actine (45 kDa) utilisée comme contrôle de charge. Dans les graphiques, les résultats sont exprimés comme l'abondance protéique comparée aux cellules non-traitées (NT) utilisées comme contrôles (colonne blanche) et représentent les moyennes ± 1 S.D. pour 3 réplicats biologiques indépendants (n=3).

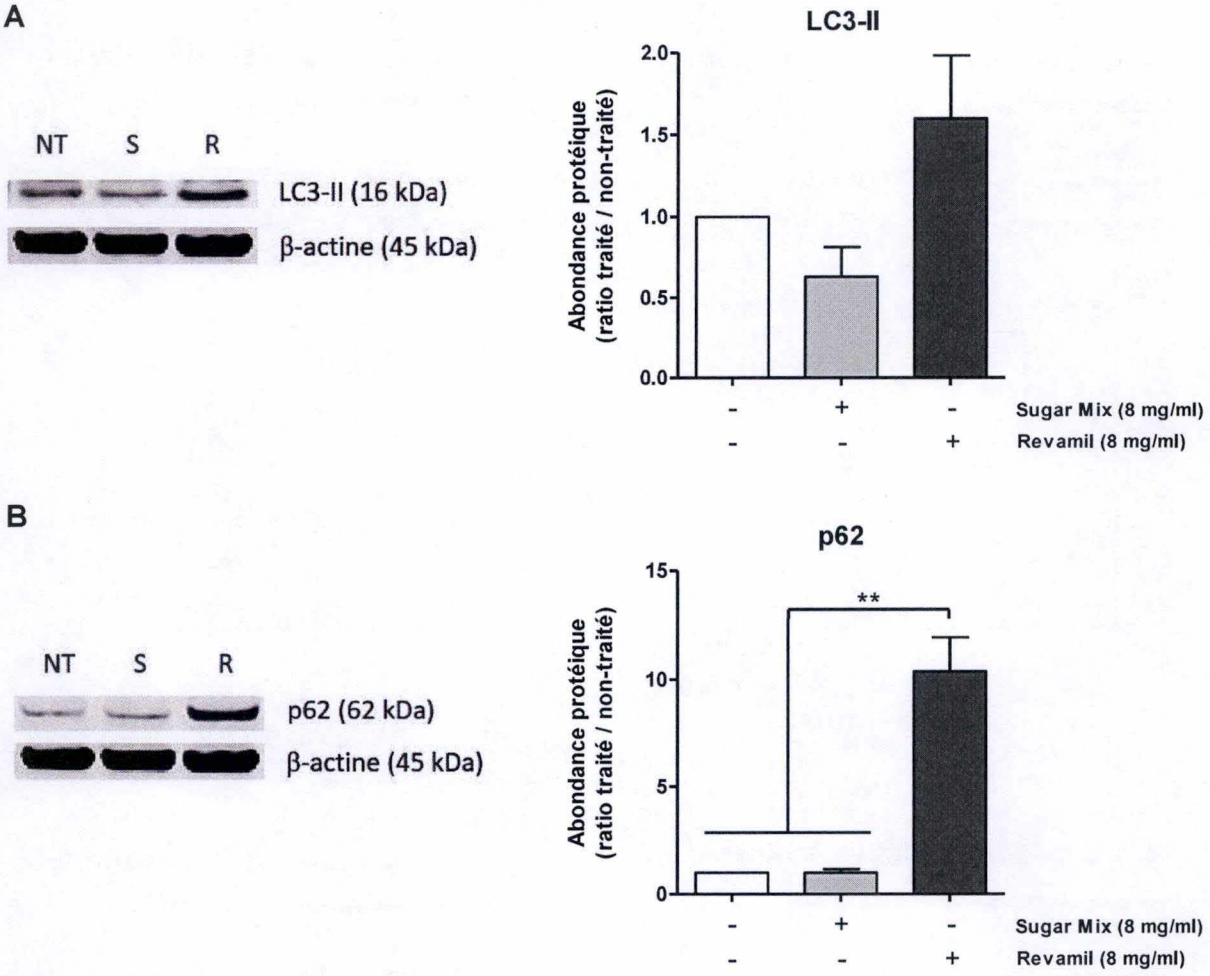


Figure 3.20. Effet du Revamil® sur l'abondance de LC3-II et p62 dans les macrophages RAW264.7.

Des macrophages RAW264.7 ont été incubés pendant 48 h dans du milieu de culture DHG-L1+ 10% de SIC contenant 8 mg/ml de Revamil® (R) ou de « Sugar mix » (S). Après préparation de lysats cellulaires, les abondances des marqueurs de l'autophagie (**A**) LC3-II (16 kDa) et (**B**) p62 (62 kDa) ont été analysées par western blot en fluorescence. Les abondances protéiques ont ensuite été quantifiées et normalisées par rapport à l'abondance de la β-actine (45 kDa) utilisée comme contrôle de charge. Dans les graphiques, les résultats sont exprimés comme l'abondance protéique comparée aux cellules non-traitées (NT) utilisées comme contrôles (colonne blanche) et représentent les moyennes ± 1 S.D. pour 3 réplicats biologiques indépendants (n=3).

3.3.2. Effets du Revamil® sur la voie mTOR dans des macrophages RAW264.7

mTOR est un régulateur central du métabolisme cellulaire, notamment impliqué dans le contrôle de la biologie des mitochondries et des lysosomes, et dans la régulation de l'autophagie (Laplante and Sabatini, 2012). Espérant mieux comprendre l'effet du miel sur la biogenèse du lysosome et son impact éventuel sur le processus autophagique, nous avons testé les niveaux d'activation de mTOR et de la S6K, un des ses substrats (Nnah *et al.*, 2015). Les abondances des formes actives et phosphorylées de mTOR (p-mTOR sur le résidu Ser2448) et de S6K (p-S6K sur le résidu Thr389), ainsi que l'abondance de leurs formes totales ont été analysées par western blot à partir de 10 µg de protéines de lysats cellulaires (Figure 3.19.) Ces lysats cellulaires ont été préparés à partir de macrophages RAW264.7 incubés pendant ou 2 ou 12 h dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix ». Les abondances des différentes formes protéiques ont été normalisées par rapport à l'abondance de la β-actine, dont l'immuno-détection est utilisée comme contrôle de charge. Les niveaux d'activation de mTOR et de la S6K ont ensuite été calculés comme un ratio entre l'abondance normalisée de la forme phosphorylée et l'abondance normalisée de la forme totale (Figure 3.19A.).

Nos résultats montrent une activation significative de mTOR et de S6K dans les cellules incubées pendant 2 h en présence de Revamil®. Cette activation est d'autant plus intéressante qu'elle est spécifiquement observée dans les cellules incubées en présence de miel. Cette activation de mTOR semble toutefois transitoire puisqu'elle n'est plus observée après une incubation de 12 h.

L'activation transitoire de mTOR est intéressante puisque cette enzyme contrôle de très nombreux processus cellulaires et métaboliques tels que la synthèse de protéines, la synthèse de lipides, la biogenèse lysosomale, et joue un rôle important dans la régulation de l'autophagie (voir Introduction point 1.1.3.1.3.). Vu l'effet discriminant du Revamil® sur l'activation transitoire de la voie mTOR, nous avons, décidé d'étudier l'effet potentiel du Revamil® sur la réponse autophagique

3.3.3. Effets du Revamil® sur la réponse autophagique dans des macrophages RAW264.7

Les abondances protéiques de LC3-II, un marqueur de la membrane des autophagosomes, et de p62, une protéine adaptatrice présente au sein de l'autophagosome et qui sera dégradée lors de l'étape d'exécution du processus autophagique, ont donc été analysées par western blot à partir de 15 µg de protéines de lysats cellulaires (Figure 3.20.). Ces lysats cellulaires ont été préparés à partir de macrophages RAW264.7 incubés pendant 48 h dans du milieu de culture contenant 8 mg/ml de Revamil® ou de « Sugar Mix ». Les abondances de LC3-II et de p62 ont été normalisées par rapport à l'abondance de la β-actine, utilisée comme contrôle de charge. Les résultats montrent que le Revamil® induit une légère augmentation de l'abondance de LC3-II et une augmentation très significative de l'abondance de p62. L'abondance de ces deux marqueurs étant simultanément plus élevée dans les cellules incubées en présence de miel, ces résultats suggèrent donc qu'un traitement au Revamil® pourrait spécifiquement inhiber le flux autophagique dans les macrophages RAW2646.7.

DISCUSSION, PERSPECTIVES & CONCLUSION

4. DISCUSSION et PERSPECTIVES

4.1. Optimisation des conditions expérimentales et caractérisation des modèles cellulaires utilisés

Pour rappel, l'objectif principal de ce mémoire était de tester les effets potentiels du miel Revamil® sur la biologie des lysosomes et des mitochondries de macrophages RAW264.7 et THP-1. Nous nous sommes également intéressés aux effets modulateurs éventuels du Revamil® sur la réponse inflammatoire de macrophages stimulés par le LPS et avons comparé les résultats obtenus à des macrophages « naïfs » non stimulés au LPS.

Vu que ce mémoire ouvre un tout nouveau projet de recherche collaboratif entre l'URBC et l'URPhyM, ce travail, à caractère exploratoire, ne reposait sur aucune donnée préliminaire. La première partie de ce mémoire a donc été consacrée à l'optimisation des conditions expérimentales et à la caractérisation des modèles cellulaires utilisés pour les analyses biologiques. En effet, l'addition de miel dans le milieu de culture des cellules est susceptible d'en modifier les composantes physico-chimiques telles que le pH ou l'osmolarité, pouvant altérer les réponses cellulaires et/ou induire certains stress. Nous avons donc tout d'abord mesuré le pH et l'osmolarité de milieux de culture contenant différentes concentrations de Revamil® ou de « Sugar Mix » (solution utilisée comme milieu contrôle permettant de discriminer les effets des sucres contenus dans le miel de ceux des composés spécifiques au miel tels que le MGO). La réponse cellulaire aux modifications osmotiques a également été étudiée par l'analyse de la phosphorylation de la MAPK p38, une enzyme phosphorylée en réponse au stress osmotique. Nous avons ensuite testé les effets cytotoxiques éventuels du Revamil® en utilisant un test de dosage de l'activité LDH libérée dans les milieux de cultures conditionnés de cellules incubées avec le Revamil®, et recherché ses effets éventuels sur la prolifération cellulaire. L'objectif de ces différentes analyses était de déterminer la concentration la plus élevée de Revamil® qui n'altère ni la viabilité cellulaire, ni la prolifération cellulaire.

Nous avons décidé de travailler avec une concentration de 8 mg/ml pour la suite des expériences. En effet, cette concentration ne modifie ni le pH, ni l'osmolarité du milieu de culture, et ne semble pas activer la MAPK p38, n'induisant donc pas de stress hyperosmotique pour les cellules. Cette concentration ne semble pas non plus altérer dramatiquement la viabilité ni la prolifération cellulaire. La concentration de 8 mg/ml de Revamil® est comparable aux concentrations de miels (Manuka et miel de Thym) utilisés dans d'autres études qui ont testé les effets cytotoxiques du miel sur des cellules MCF7 (cancer du sein) ou de cellules PC3 (cancer de la prostate) (Yaacob and Ismail, 2014; Abel and Baird, 2017). Ces études ont notamment montré qu'une concentration en miel de 10 mg/ml n'était pas suffisante pour induire une mort cellulaire des cellules cancéreuses.

Nous nous sommes également intéressés aux effets potentiels du Revamil® sur la polarisation des macrophages RAW264.7 et THP-1. Nous avons donc évalué les effets du Revamil® sur l'expression de gènes marqueurs couramment utilisés pour la caractérisation des phénotypes M1 et M2 de macrophages polarisés. Dans un premier temps, un modèle de polarisation des macrophages RAW264.7 en macrophages M1 (obtenus en réponse à une stimulation des cellules par du LPS à 10 ng/ml et de l'IFNγ à 20 ng/ml) et M2 (obtenus en réponse à une stimulation par de l'IL-4 et de l'IL-13 à 20 ng/ml) a été implémenté sur base des données de la littérature (Lopez-Castejón *et al.*, 2011; Pireaux *et al.*, 2016). Ce modèle a été établi en analysant, par RT-qPCR, l'expression de plusieurs gènes décrits comme étant des gènes marqueurs du phénotype M1 (*iNOS* et *IL-6*) ou du phénotype M2 (*MRC1* et *Arg 1*). Comme attendu, l'expression des gènes codant pour l'iNOS et l'IL-6 est augmentée/induite dans des macrophages M1, et l'expression des gènes codant pour MRC1 et l'Arg 1 est activée dans des macrophages M2. Une fois le modèle de polarisation des RAW264.7 établi, l'effet modulateur éventuel du Revamil® sur l'expression de ces gènes marqueurs a été testé. En effet, certaines études ont montré un effet immunomodulateur du miel qui stimulerait la production de

cytokines pro-inflammatoires telles que le TNFα, l'IL-6 et l'IL-1β (Tonks *et al.*, 2003; Kalantari *et al.*, 2016). Nous pouvions donc nous attendre à observer des effets comparables concernant le Revamil®, et donc penser que la polarisation M1 des macrophages serait renforcée en présence de Revamil®. Les résultats (Figure 3.7B.) montrent que, le Revamil® semble bien induire une augmentation de l'expression des gènes marqueurs du phénotype M1 (iNOS et IL-6) et conduire à une diminution de l'expression des gènes marqueurs du phénotype M2 (MRC1 et Arg 1) et ce, d'une manière dépendante de la concentration en miel. Cependant, ces effets ne sont pas provoqués par des composés spécifiques au Revamil® mais bien aux sucres présents dans le miel puisque les macrophages incubés en présence de « Sugar Mix » présentent un profil d'expression comparable à ceux qui ont été exposés au Revamil®. Des études menées sur des monocytes THP-1 ont d'ailleurs mis en évidence que l'exposition des cellules à des traitements riches en glucose (15 mM pendant 72h) provoque une augmentation de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IL-1β) et ce, suite à l'activation de NF-κB, un facteur de transcription qui régule l'expression de ce gène (Shanmugam *et al.*, 2003). L'effet éventuel du Revamil® sur l'expression des gènes marqueurs des polarisations M1 ou M2 du macrophage pourrait également être analysé dans des macrophages M0. Cette perspective permettrait de savoir si le miel, par lui-même, stimule l'expression de ces gènes (ou d'autres comme l'IL-1β, le TNFα, ou l'IL-10) dans des macrophages M0 non activés.

Enfin, nous avons également étudié les effets du Revamil® sur la morphologie mitochondriale et l'abondance lysosomale de macrophages THP-1 au cours de leur différenciation en macrophages M0, puis lors de leur polarisation en macrophages M1 et M2. Ces analyses ont été réalisées sur cellules vivantes à l'aide de sondes fluorescentes spécifiques MitoTracker® green et LysoTracker® red DND-99, marquant respectivement les mitochondries (indépendamment de leur potentiel membranaire) et les compartiments acides, dont les lysosomes. Au regard des résultats (Figures 3.8. et 3.9.), le Revamil® ne semble pas avoir d'effet sur la morphologie de la population mitochondriale, ni sur l'abondance des lysosomes.

En raison de l'absence d'effet du Revamil® sur l'expression de gènes marqueurs de ces paramètres de la biologie mitochondriale et lysosomale au cours de la polarisation des macrophages, nous avons décidé de passer à l'étude des effets du Revamil® sur les organites dans des macrophages au LPS. Le but étant d'activer les macrophages par une stimulation par le LPS à une concentration de 100 ng/ml, concentration qui est bien plus élevée que la concentration utilisée pour la polarisation de macrophages M0 en macrophages M1. Les expériences suivantes ont donc été réalisées dans le but d'étudier un effet modulateur éventuel du Revamil® sur la biologie des mitochondries et des lysosomes dans un contexte pro-inflammatoire.

4.2. Effets du Revamil® sur la biologie des mitochondries et des lysosomes de macrophages stimulés ou non au LPS

La deuxième partie de ce mémoire fut donc consacrée à l'étude des effets potentiels du Revamil® sur la morphologie et l'abondance des mitochondries et sur l'abondance des lysosomes dans des macrophages « naïfs » ou stimulés avec 100 ng/ml de LPS. Différentes approches expérimentales (microscopie confocale, cytométrie de flux, analyse d'expression de gènes par western-blot) ont été utilisées afin de fournir une réponse la plus fiable possible.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet du Revamil® sur la morphologie de la population mitochondriale de macrophages « naïfs » ou stimulés par 100 ng/ml de LPS. Les résultats ont montré que le Revamil® ne semble pas avoir d'effet sur la morphologie (état de fragmentation) mitochondriale des macrophages THP-1, que les cellules soient stimulées ou non par le LPS. De plus, et de manière inattendue, une stimulation des THP-1 au LPS ne semble pas modifier la morphologie des mitochondries, alors que plusieurs études ont rapporté que le LPS induit une fission du réseau mitochondrial suite à une diminution de l'expression de MFN1 et de la phosphorylation de DRP-1 sur

le résidu Ser637 (Park *et al.*, 2013 ; Baker *et al.*, 2014). La fragmentation du réseau mitochondrial dans ces conditions pourrait donc résulter à la fois, d'un déficit de fusion et d'une fission dépendante de DRP-1.

Une hypothèse que l'on peut avancer pour tenter d'expliquer ces différences serait que l'effet du LPS sur la morphologie mitochondriale pourrait être masqué par les effets du PMA (150 nM) utilisé pour la différentiation des monocytes THP-1 en macrophages M0. En effet, le PMA est une molécule connue pour stimuler de nombreuses voies de signalisation telles que les voies PKC/MAPK, PKC/NF-κB et PI3K/Akt/mTOR impliquées dans la survie cellulaire et l'initiation de l'inflammation (Weng *et al.*, 2008). Le PMA à 200 nM est également décrit pour induire une fragmentation des mitochondries de macrophages MDM (« *monocyte-derived macrophages* ») et de monocytes THP-1 (Daigneault *et al.*, 2010). Dès lors, même si une période de repos sans PMA est prévue dans le protocole de différenciation, le PMA utilisé pour différencier les THP-1 en macrophages, les rendant adhérents et donc utilisables pour les analyses en microscopie confocale, pourrait masquer le phénotype de fragmentation attendu suite à la stimulation par le LPS. Ceci expliquerait également pourquoi aucune différence de morphologie mitochondriale n'est observée entre des cellules traitées au LPS ou non. De plus, connaissant les effets du PMA sur l'activation de la voie de signalisation mTOR (Liu *et al.*, 2017), les macrophages THP-1 n'ont pas été utilisés pour les analyses des effets potentiels du Revamil® sur les voies de signalisation mTOR et sur l'autophagie.

Les effets potentiels du Revamil® ont donc été été analysé sur l'abondance des mitochondries dans des macrophages RAW264.7 « naïfs » ou stimulés avec 100 ng/ml de LPS. Les analyses réalisées en cytométrie de flux à l'aide de la sonde fluorescente MitoTracker® green ont révélé que le Revamil® ne semble pas avoir d'effet modulateur sur l'intensité du signal fluorescent du MitoTracker® green dans des macrophages RAW264.7 stimulés au LPS (Figure 3.11C.). Toutefois, une incubation des cellules en présence de Revamil® seul provoque une augmentation de l'intensité du signal MitoTracker® green. Ce résultat nous a fait penser initialement que le Revamil® pouvait conduire à une augmentation de l'abondance mitochondriale, et ce independemment de sa composante « sucres » puisque l'augmentation du signal de fluorescence n'est pas observée pour des macrophages incubés en présence de « Sugar Mix » (Figure 3.11A.). Ces résultats ont été confirmés en microscopie confocale dans les mêmes conditions de traitement et de marquage mitochondrial (Figure 3.12.). Cette augmentation de l'intensité du signal MitoTracker® green serait donc probablement due à un ou plusieurs composé(s) spécifique(s) du Revamil®.

Pour tenter de répondre à cette hypothèse, nous avons testé l'effet du MGO, un composé dicarbonylé présent dans le Revamil® à une concentration de 0,25 mM (Kwakman *et al.*, 2011; Le Bihan, 2016), sur l'abondance du signal de fluorescence de la sonde MitoTracker® green des macrophages RAW264.7, incubés en présence ou en absence de « Sugar Mix ». Les résultats (Figure 3.11B.) montrent que le MGO ne semble pas être responsable de l'augmentation de l'intensité du signal MitoTracker® green observé en présence de Revamil®. Il serait donc intéressant de tester si d'autres composants du Revamil® (comme l'H_2O_2, les défensines, l'acide gluconique produit par la glucose oxydase (l'enzyme la plus abondante du miel) ou certains flavonoïdes telles que la lutéoline, la quercetine ou la chrysine (Kwakman *et al.*, 2011)) pourraient être responsables des effets observés.

Cependant, ces observations ne semblent pas corrélées à un effet stimulateur du Revamil® sur l'abondance de la population mitochondriale ou la biogenèse de l'organite. En effet, aucun effet du Revamil® n'a pu être observé sur l'abondance des marqueurs protéiques de la mitochondrie comme TOM20 et VDAC ni sur l'abondance de PGC-1α, le coactivateur transcriptionnel de la biogenèse mitochondriale. Toutefois, en plus de l'abondance de PGC-1α, son activation devrait également être étudiée car l'activité de ce régulateur est contrôlée par de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou l'acétylation. Ce paramètre serait facilement analysable par western blot en suivant l'abondance de la forme active phosphorylée de PGC-1α (sur le résidu

Ser570 par Akt, ou les résidus Thr177 et Ser538 par l'AMPK) (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011) et ce, sur des lysats de cellules incubées en présence de Revamil®. Des arguments supplémentaires renforcent l'hypothèse que le Revamil® ne stimule pas la biogenèse mitochondriale (respectant la stoechiométrie des différents acteurs protéiques) proviennent des dosages de la cytochrome c oxydase. En effet, le Revamil®, mais plus encore le milieu contenant les sucres conduit à une augmentation de l'activité de l'enzyme.

Même si nous n'avons pas encore d'explication quant au mécanisme, nous pouvons conclure que le Revamil® semble induire une accumulation différentielle de la sonde fluorescente MitoTracker® green au niveau des mitochondries. Différentes hypothèses pourraient expliquer cette observation. D'une part, comme la sonde MitoTracker® green marquerait (selon la firme Molecular Probes) la cardiolipine présente en forte concentration dans la membrane mitochondriale interne et ce, indépendamment du potentiel de membrane mitochondrial, il serait intéressant d'analyser la concentration en cardiolipine dans les mitochondries de cellules incubées en présence de Revamil® en la quantifiant grâce à un dosage fluorimétrique par exemple (Cardiolipin Assay Kit (Fluorometric) de BioVision). D'autre part, contrairement à ce qu'annonce la firme Molecular Probes et certaines études montrant que le marquage des mitochondries au MitoTracker® green est insensible au potentiel membranaire mitochondrial (Pendergrass *et al.*, 2004), d'autres études suggèrent que le marquage des mitochondries avec le MitoTracker® green pourrait dépendre du potentiel membranaire mitochondrial (Keij *et al.*, 2000). Il serait facile de répondre à cette question en évaluant l'effet putatif du Revamil® sur le potentiel membranaire mitochondrial par cytométrie de flux et/ou par microscopie confocale grâce à la sonde JC-1 (Cossarizza *et al.*, 1993; Reers *et al.*, 1995). La sonde JC-1 est intéressante car elle peut marquer à la fois les mitochondries polarisées (émission du fluorochrome dans le rouge) et les mitochondries dépolarisées (émission dans le vert) sur des cellules vivantes. Si le Revamil® conduit à une modification du potentiel membranaire mitochondrial, la sonde MitoTracker® pourrait s'accumuler de manière préférentielle dans les mitochondries des cellules incubées en présence de miel.

Dans un second temps, nous avons testé l'effet du Revamil® sur l'abondance des lysosomes de macrophages « naïfs » ou stimulés par 100 ng/ml de LPS. Pour ces analyses, la sonde LysoTracker® red DND-99 a été choisie et il est important de noter qu'elle ne marque pas uniquement les lysosomes vu qu'elle est constituée d'un fluorophore composé d'une base faible (Molecular Probes) et possède donc un tropisme pour les compartiments acides. Deux paramètres ont été analysés avec le LysoTracker® red DND-99 : la surface occupée par les structures marquées rapportée à la surface cellulaire (analysées en microscopie confocale), et l'intensité du signal fluorescent (analysé en cytométrie de flux). Les résultats montrent que le Revamil® conduit à une augmentation de la surface occupée par les compartiments acides après 12 h d'incubation, et dans une moindre mesure, après 24 h d'incubation des cellules et ce, en présence ou en absence de LPS. Pour le temps d'incubation plus long, une contribution des sucres à l'augmentation du marquage apparaît également. Suite à un traitement de 48 h, le Revamil® conduit à une augmentation de l'intensité du signal LysoTracker® mais n'a pas d'effet sur le marquage de l'organite dans des cellules incubées en présence de LPS. Ces observations suggèrent un effet stimulateur d'un ou de plusieurs composé(s) spécifique(s) du Revamil® sur la biogenèse des compartiments acides comme le lysosome. Tout comme pour les analyses sur l'abondance mitochondriale, ce n'est pas le MGO qui est responsable de l'augmentation du signal de fluorescence associé au LysoTracker® red. De plus, vu l'absence d'effet du Revamil® sur 1) l'abondance de la protéine lysosomale membranaire LAMP-1 et ce, quel que soit le traitement cellulaire ou le temps d'incubation, et 2) l'absence d'augmentation de l'activité des enzymes hydrolytiques lysosomales (telles que la β-galactosidase, la β-hexosaminidase et la cathepsine C), nous pouvons conclure que l'effet du Revamil® sur l'augmentation du marquage par le LysoTracker® pourraient être le reflet du marquage, non pas des lysosomes, mais de l'accumulation d'autres compartiments acides tels que les endosomes ou les autophagosomes, qui présentent également un pH

acide (compris entre 5 et 6)), bien que légèrement plus élevé que celui des lysosomes (compris entre 4 et 4,5) (Appelqvist *et al.*, 2017). Une façon de vérifier cela serait d'analyser l'effet du Revamil® sur l'abondance de marqueurs protéiques spéciques aux endosomes (comme Rab7) ou aux autophagosomes (comme LC3-II et p62) en western blot et/ou en immunofluorescence. L'analyse de l'effet du Revamil® sur l'abondance protéique de LC3-II et p62 a notamment été réalisée dans ce projet et a montré un effet inhibiteur du flux autophagique (voir plus bas).

Au regard des résultats précédemment obtenus concernant un effet du Revamil® sur l'abondance des compartiments acides, nous avons décidé de nous intéresser aux éventuels effets du Revamil® sur l'activation de la sérine/thréonine kinase mTOR, impliquée dans la biogenèse lysosomale et l'autophagie par la régulation du facteur de transcription TFEB (Settembre *et al.*, 2012). De manière très intéressante, les résultats montrent une activation de mTOR et de S6K (un des substrats de mTOR) dans les cellules incubées pendant 2 h en présence de Revamil®. Cette activation est spécifiquement observée pour les cellules incubées en présence de miel mais semble transitoire puisqu'elle n'est plus observée pour une incubation de 12 h. Une expérience supplémentaire permettant d'étudier l'activation de mTOR pourrait être envisagée, en réalisant un co-immunomarquage en immunofluorescence de mTOR et de LAMP-1 dans des cellules incubées en présence de Revamil® ou de « Sugar Mix » afin d'évaluer une éventuelle colocalisation entre ces deux protéines (Korolchuk *et al.*, 2011). En effet, lorsqu'elle est activée, mTOR transloque à la surface de la membrane lysosomale en formant le complexe mTORC1 (Nnah *et al.*, 2015). De plus, le fait que S6K, une cible directe de mTOR, suive le même état d'activation à 2 et 12 h d'incubation conforte l'idée de l'activation d'une des voies de signalisation dépendant de mTOR dans les macrophages incubés en présence de Revamil®.

La première question qui se pose à présent est d'identifier quel composé du Revamil® pourrait activer la voie mTOR. Malgré sa composition pauvre en composition en acides aminés, la proline représente 50 à 85 % de l'ensemble des acides aminés présents dans le miel (Missio da Silva *et al.*, 2016). Cet apport supplémentaire en proline pourrait expliquer, du moins en partie, une activation de mTOR. En effet, une étude a montré que la présence de proline (en présence de leucine) peut activer la voie de signalisation mTOR dans des cellules HeLa (Dyachok *et al.*, 2016). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en analysant l'effet de la proline (en présence ou non de leucine), utilisée à une concentration comparable à celle présente dans le Revamil®, sur l'activation de mTOR en suivant l'abondance des formes phosphorylée et totale par western blot. Pour cela, il nous faudrait tout d'abord déterminer les concentrations exactes de ces acides aminés dans le Revamil®. Nous pourrions aussi imaginer que la composition du Revamil® en flavonoïdes pourrait également contribuer à l'activation de mTOR. Cependant des études menées sur des flavonoïdes tels que la lutéoline, la quercetine et la chrysine (présents dans le miel (Saha, 2015)) ont montré qu'ils engendraient une inhibition de mTOR (Shao *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017; Granato *et al.*, 2017). Nous émettons également l'hypothèse que le MGO présent dans le Revamil® pourrait être responsable de l'activation de mTOR bien qu'une étude menée sur des cellules neuronales (HT22) révèle que le MGO est capable d'induire une activation de l'AMPK et donc une inhibition de mTOR (Dafre *et al.*, 2017). Finalement, afin de tenter d'identifier la voie de signalisation impliquée dans l'activation de mTOR en présence de Revamil®, il serait intéressant d'étudier l'effet du Revamil® sur la voie PI3K-Akt ou sur la voie dépendante des GTPases Rag en analysant, respectivement, l'abondance des formes phosphorylées d'Akt (phosphorylation sur les résidus Thr308 et Ser 403) ou l'abondance des Rag A/B/C/D.

Une autre question sur cette activation transitoire de mTOR par le Revamil® se pose également : quels seraient les mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de mTOR après 12 h d'incubation avec le Revamil® ? Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction (voir point 1.1.2.3.2.), l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée par les macrophages M2 qui est responsable de la régulation négative des fonctions pro-inflammatoires des macrophages en y instaurant une boucle de rétroinhibition. L'équipe de Ip *et al.* (2017), a notamment montré que cette

boucle de rétroinhibition imposée par l'IL-10, dont l'expression est en partie régulée par mTOR, induit à son tour une inhibition de mTOR, permettant de limiter le rôle de mTOR dans les fonctions pro-inflammatoires des macrophages. Ainsi, dans notre modèle, de l'IL-10 pourrait être synthétisée et libérée en réponse à l'activation de mTOR par le Revamil® (après 2 h d'incubation). La présence de la cytokine expliquerait ensuite l'inhibition de mTOR après 12 h d'incubation. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de suivre l'expression de l'IL-10 dans des macrophages traités au Revamil® (au niveau du transcrit par RT-qPCR par exemple et son dosage dans les milieux conditionnés de cellules par ELISA) et de suivre l'activation de mTOR par phosphorylation en western blot et ce, dans une cinétique entre 2 h et 12 h d'incubation (avec des temps de 4 et 8 h par exemple) afin de mieux évaluer le moment auquel l'inhibition de mTOR est observée.

Enfin, la mise en évidence de l'activation transitoire de mTOR est intéressante puisque cette enzyme contrôle de très nombreux processus cellulaires et métaboliques tels que la synthèse de protéines, la synthèse de lipides, la biogenèse lysosomale, et joue un rôle important dans la régulation de l'autophagie (voir introduction point 1.1.3.1.3.). Vu l'effet du Revamil® sur l'activation transitoire de la voie mTOR, nous avons, pour terminer ce travail, décidé d'étudier l'effet potentiel du Revamil® sur la réponse autophagique en analysant l'abondance de LC3-II (un récepteur présent en membrane des autophagosomes) et de p62 (une protéine adaptatrice qui lie le cargo à dégrader par un motif ubiquitine, et se lie au récepteur LC3-II) au niveau protéique par western blot. Les résultats ont montré que le Revamil® pourrait spécifiquement inhiber le flux autophagique puisqu'une augmentation simultanée de l'abondance de LC3-II et de p62 est observée et ce, uniquement dans les cellules incubées en présence de miel. Ces résultats sont en accord avec l'activation de mTOR en présence de Revamil®, mais aussi avec l'effet du Revamil® sur l'abondance de compartiments acides (observés avec la sonde LysoTracker®) dont font partie les autophagosomes qui sont probablement « figés » dans la cellule suite à l'inhibition du flux autophagique.

Afin de mieux comprendre quand l'inhibition du flux autophagique se met en place, il serait intéressant d'évaluer l'abondance de LC3-II et p62 dans une cinétique reprenant des temps d'incubations plus courts (temps d'incubation de 2, 4, 8 et 12 h), tout comme pour le suivi de l'activation de mTOR proposée ci-dessus. Afin d'appuyer ces résultats, il pourrait également être intéressant de rechercher si cette inhibition du flux autophagique par le Revamil® est liée à une inhibition de l'activité des kinases ULK1 et Vps34 (toutes deux impliquées dans l'initiation de la réponse autophagique).

Un autre acteur important dans la régulation de l'autophagie est le facteur de transcription TFEB, qui est également une cible de mTOR (voir Introduction point 1.1.3.1.2.3.). Tenter d'analyser les effets potentiels du Revamil® sur l'abondance et la fonction de TFEB serait donc très intéressant. Ceci peut s'envisager grâce à des techniques telles que : 1) l'analyse de la translocation nucléaire de TFEB en présence de Revamil® par immunofluorescence en microscopie confocale; ou 2) l'étude de l'abondance et de l'activation de TFEB en présence de Revamil® sur des fractions protéiques cytoplasmiques et nucléaires en western blot. L'activation de TFEB en western-blot peut être analysée en suivant l'abondance de la forme phosphorylée de TFEB sur le résidu Ser211, qui est la forme inactive de TFEB, retenue dans le cytosol par l'interaction avec des protéines 14-3-3 (Roczniak-Ferguson *et al.*, 2012). Dès lors, selon les résultats montrant l'activation de mTOR qui induit une phosphorylation inhibitrice de TFEB sur le résidu Ser211, nous pourrions nous attendre à une augmentation de l'abondance de la forme phosphorylée de TFEB au niveau du cytoplasme, et donc une inhibition de sa translocation nucléaire suite à sa séquestration par des protéines 14-3-3 en présence de Revamil®.

5. CONCLUSION GENERALE

Au terme de ce mémoire, nous pouvons retirer quelques conclusions sur les effets du miel Revamil® sur la biologie des mitochondries et des lysosomes. De manière encore incomprise, le Revamil® induit un marquage différentiel des mitochondries avec la sonde MitoTracker® green, mais probablement sans affecter l'abondance ni la morphologie mitochondriale. Ces observations méritent d'être approfondies notamment au niveau d'un effet éventuel du Revamil® sur une altération du potentiel membranaire des mitochondries. Parallèlement, le Revamil® semble ne pas avoir d'effet sur l'abondance des lysosomes (malgré également un marquage plus important des compartiments acides), mais plutôt sur celle des organites de l'autophagie : les autophagosomes. En effet, le Revamil® induit une activation (précoce et transitoire) de mTOR compatible avec une inhibition du flux autophagique observée plus tardivement.

Ces effets du Revamil® sur l'activation de mTOR et l'inhibition de l'autophagie rappellent ceux du LPS responsable de la stimulation des fonctions pro-inflammatoires des macrophages en activant la voie mTOR menant à l'inhibition des mécanismes d'autophagie et empêchant ainsi la séquestration des composés de l'inflammasome, ce qui permet son assemblage, son activation et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β et l'IL-18 (voir Introduction, point. 1.1.3.3.). Dès lors, le Revamil® pourrait stimuler les fonctions pro-inflammatoires des macrophages par des mécanismes comparables, en plus d'un effet potentiel de sa composition particulière en sucres sur une stimulation de la polarisation de macrophages en macrophages M1 et des changements d'expression génique qui y sont associés.

Rappelons cependant que le miel Revamil® exerce aussi un effet immunomodulateur en préparant les macrophages à une éventuelle réponse inflammatoire, permettant la mise en place de réponses anti-inflammatoires et de réparation tissulaire accélérées et plus efficaces, ce qui favoriserait la résolution et l'arrêt de l'inflammation, ainsi que la cicatrisation d'une éventuelle lésion, des propriétés reconnues pour le miel mais qui doivent encore faire l'objet d'études futures pour mieux comprendre ses effets sur la biologie de la cellule eucaryote et de ses organites.

BIBLIOGRAPHIE

6. BIBLIOGRAPHIE

Abel, S.D.A., and Baird, S.K. (2017). Honey is cytotoxic towards prostate cancer cells but interacts with the MTT reagent: considerations for the choice of cell viability assay. Food Chem.

Aderem, A. (2003). Phagocytosis and the Inflammatory Response. J. Infect. Dis. *187*, 340–345.

Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors : critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat. Immunol. *2*, 675–680.

Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci. *75*, 639–653.

Alam, F., Islam, A., Gan, S.H., and Khalil, I. (2014). Honey : A Potential Therapeutic Agent for Managing Diabetic Wounds. Evidence-Based Complement. Altern. Med. *2014*, 1–16.

Almasaudi, S.B., Abbas, A.T., Al-Hindi, R.R., El-Shitany, N.A., Abdel-Dayem, U.A., Ali, S.S., Saleh, R.M., Al Jaouni, S.K., Kamal, M.A., and Harakeh, S.M. (2017). Manuka Honey Exerts Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities That Promote Healing of Acetic Acid-Induced Gastric Ulcer in Rats. Evidence-Based Complement. Altern. Med. *2017*, 1–13.

Alvarez-Suarez, J., Gasparrini, M., Forbes-Hernández, T., Mazzoni, L., and Giampieri, F. (2014). The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. Foods *3*, 420–432.

Al-waili, N.S., Salom, K., and Al-ghamdi, A.A. (2011). Honey for Wound Healing , Ulcers , and Burns ; Data Supporting Its Use in Clinical Practice. Sci. World J. *11*, 766–787.

Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil Function : From Mechanisms to Disease. Annu. Rev. Immunol. *30*, 459–489.

Anand, P.K., Malireddi, R.K.S., and Kanneganti, T. (2011). Role of the Nlrp3 inflammasome in microbial infection. Front. Microbiol. *2*, 1–6.

Anding, A.L., and Baehrecke, E.H. (2017). Cleaning House : Selective Autophagy of Organelles. Dev. Cell *41*, 10–22.

Andreakos, E., Sacre, S.M., Smith, C., Lundberg, A., Kiriakidis, S., Stonehouse, T., Feldmann, M., and Foxwell, B.M. (2004). Distinct pathways of LPS-induced NF-κB activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. Immunobiology *103*, 2229–2238.

Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., and Starkov, A.A. (2005). Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. Biochemistry *70*, 200–214.

Appelmans, F., Wattiaux, R., and de Duve, C. (1955). Tissue Fractionation Studies: the association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. Biochem. J. *59*, 438–445.

Appelqvist, H., Wäster, P., Kågedal, K., and Öllinger, K. (2017). The lysosome : from waste bag to potential therapeutic target. J. Mol. Cell Biol. *5*, 214–226.

Atrott, J., Haberlau, S., and Henle, T. (2012). Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (Leptospermum scoparium) honey. Carbohydr. Res. *361*, 7–11.

Baker, B., Maitra, U., Geng, S., and Li, L. (2014). Molecular and cellular mechanisms responsible for cellular stress and low-grade inflammation induced by a Super-low dose of endotoxin. J. Biol. Chem. *289*, 16262–16269.

Bandyopadhyay, D., Cyphersmith, A., Zapata, J.A., Kim, Y.J., and Payne, C.K. (2014). Lysosome Transport as a Function of Lysosome Diameter. PLoS One *9*, 18–23.

Becker, T., Böttinger, L., and Pfanner, N. (2012). Mitochondrial protein import : from transport pathways to an integrated network. Trends Biochem. Sci. *37*, 85–91.

Bereiter-Hahn, J., and Voth, M. (1994). Dynamics of Mitochondria in Living Cells : Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria. Microsc. Res. Tech. *27*, 198–219.

Le Bihan, A. (2016). Les pansements au miel dans la cicatrisation des plaies aiguës et chroniques. Université de Rennes.

van der Bliek, A.M., Shen, Q., and Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*, a011072–a011072.

Brown, D.A., and Passmore, G.M. (2010). Some new insights into the molecular mechanisms of pain perception. J. Clin. Invest. *120*, 1380–1383.

Calvo, S.E., Clauser, K.R., and Mootha, V.K. (2016). MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. Nucleic Acids Res. *44*, 1251–1257.

Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. Diabetes *57*.

Cantó, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha , SIRT1 and AMPK , an energy sensing network that controls energy expenditure. Curr. Opin. Lipidol. *20*, 98–105.

Carruthers, V.B. (2015). Parasites and Their Heterophagic Appetite for Disease. PLoS Pathog. *11*, 10–13.

Castellano, B.M., Thelen, A.M., Moldavski, O., Feltes, M., van der Welle, R.E.N., Mydock-McGrane, L., Jiang, X., van Eijkeren, R.J., Davis, O.B., Louie, S.M., et al. (2017). Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9 – Niemann- Pick C1 signaling complex. Science (80-.). *355*, 1306–1311.

Cebollero, E., Reggiori, F., and Kraft, C. (2012). Reticulophagy and Ribophagy : Regulated Degradation of Protein Production Factories. Int. J. Cell Biol.

Chan, F.K.-M., Moriwaki, K., and De Rosa, M.J. (2013). Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase. Methods Mol. Biol. *979*, 65–70.

Chang, C., and Blackstone, C. (2017). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1201*, 34–39.

Cho, S., Du, Q., Huang, S., and Dong, Z. (2010). Drp1 dephosphorylation in ATP depletion-induced mitochondrial injury and tubular cell apoptosis. Am. J. Ren. Physiol. *299*, 199–206.

Cicchini, M., Karantza, V., and Xia, B. (2015). Molecular Pathways : Autophagy in Cancer — A Matter of Timing and Context. Clin. Cancer Res. *21*, 498–505.

Coffey, J.W., and de Duve, C. (1968). Digestive Activity of Lysosomes. J. Biol. Chem. *243*, 3255–3263.

Colaço, A., and Jäättelä, M. (2017). Ragulator — a multifaceted regulator of lysosomal signaling and trafficking. J. Cell Biol. 1–4.

Collins, Y., Chouchani, E.T., James, A.M., Menger, K.E., Cocheme, H.M., and Murphy, M.P. (2012). Mitochondrial redox signalling at a glance. J. Cell Sci. *125*, 801–806.

Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., Sánchez de Medina, F., and Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids : Analysis of the structure – activity relationship. Biochem. Pharmacol. *72*, 1010–1021.

Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., and Franceschi, C. (1993). A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). Biochem. Biophys. Res. Commun. *197*, 40–45.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature *420*, 860–867.

Crane, E. (1991). Honey from honeybees and other insects. Ethology, Ecol. Evol. *1*, 101–105.

Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim. Biophys. Acta *1773*, 1358–1375.

Dafre, A.L., Schmitz, A.E., and Maher, P. (2017). Methylglyoxal-induced AMPK activation leads to autophagic degradation of thioredoxin 1 and glyoxalase 2 in HT22 nerve cells. Free Radic. Biol. Med. *108*, 270–279.

Daigneault, M., Preston, J.A., Marriott, H.M., Whyte, M.K.B., and Dockrell, D.H. (2010). The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. PLoS One *5*.

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

Delaive, E., Arnould, T., Raes, M., and Renard, P. (2008). A sensitive three-step protocol for fluorescence-based Western blot detection. J. Immunol. Methods *334*, 51–58.

Delavary, B.M., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B., and Beelen, R.H.J. (2011). Macrophages in skin injury and repair. Immunobiology *216*, 753–762.

Ding, W.-X., and Yin, X.-M. (2013). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. Biol. Chem. *393*, 547–564.

Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat. Rev. Cancer *4*.

Duque, G.A., and Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. Front. Immunol. *5*, 1–12.

De Duve, C., and Wattiaux, R. (1965). Functions of Lysosomes. Annu. Rev. Physiol. *28*, 435–492.

Dyachok, J., Earnest, S., Iturraran, E.N., Cobb, M.H., and Ross, X.E.M. (2016). Amino Acids Regulate mTORC1 by an Obligate Two-step. J. Biol. Chem. *291*, 22414–22426.

Van Eijk, W., and Groenhart, O. (2006). Sweet after acid - Revamil Honey gel, a successful remedy for wounds. WCS News 1–8.

Eisenberg-Lemer, A., Bialik, S., Simon, H.-U., and Kimchi, A. (2009). Life and death partners : apoptosis , autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Differ. *16*, 966–975.

Ekdahl, K.N., Teramura, Y., Hamad, O.A., Asif, S., Duehrkop, C., Fromell, K., Gustafson, E., Hong, J., Kozarcanin, H., Magnusson, P.U., et al. (2016). Dangerous liaisons : complement , coagulation , and kallikrein / talk act as a linchpin in the events leading to thromboinflammation. Immunol. Rev. *274*, 245–269.

Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M., and Hall, R.P. (2007). Inflammation in Wound Repair : Molecular and Cellular Mechanisms. J. Invest. Dermatol. *127*, 514–525.

Eskelinen, E. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. Mol. Aspects Med. *27*, 495–502.

Eskelinen, E., Tanaka, Y., and Saftig, P. (2003). At the acidic edge : emerging functions for lysosomal membrane proteins. Trends Cell Biol. *13*, 137–145.

Esser, N., Legrand-poels, S., Piette, J., Scheen, J., and Paquot, N. (2014). Inflammation as a link between obesity , metabolic syndrome and type 2 diabetes. Diabetes Res. Clin. Pract. *105*, 141–150.

Feng, X., Qin, H., Shi, Q., Zhang, Y., Zhou, F., Wu, H., Ding, S., Niu, Z., Lu, Y., and Shen, P. (2014). Chrysin attenuates inflammation by regulating M1 / M2 status via activating PPAR g. Biochem. Pharmacol. *89*, 503–514.

Fernandez-Marcos, P.J., and Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. Am. J. Clin. Nutr. *93*, 884–890.

Ferreira, C.R., and Gahl, W. (2017). Lysosomal storage diseases. Transl. Sci. Rare Dis. *2*, 1–71.

Frank, M.M., and Fries, L.F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. Immunol. Today *12*, 322–326.

Freeman, S.A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis : receptors, signal integration, and the cytoskeleton. Immunol. Rev. *262*, 193–215.

Friedman, J.R., and Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. Nature *505*, 335–343.

Ganz, T. (2004). Defensins : antimicrobial peptides of vertebrates. C. R. Biol. *327*, 539–549.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., and Jore, D. (2003). Espèces réactives de l ' oxygène Comment l ' oxygène peut-il devenir toxique ? Mécanismes Biochim. 91–96.

Gazi, U., and Martinez-Pomares, L. (2009). Influence of the mannose receptor in host immune responses. Immunobiology *214*, 554–561.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. Immunity *19*, 71–82.

Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., and Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. BMC Cancer *15*, 577.

Georgakopoulos, N.D., Wells, G., and Campanella, M. (2017). The pharmacological regulation of cellular mitophagy. Nat. Chem. Biol. *13*, 136–146.

Gerencser, A.A., Chinopoulos, C., Birket, M.J., Jastroch, M., Vitelli, C., Nicholls, D.G., and Brand, M.D. (2012). Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells : calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. Jounal Physiol. *12*, 2845–2871.

Ghebrehiwet, B., Kaplan, A.P., Joseph, K., and Peerschke, E.I.B. (2016). The complement and contact activation systems: partnership in pathogenesis beyond angioedema. Immunol. Rev. *274*, 281–289.

Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszynski, J., Wieckowski, M.R., and Pinton, P. (2015). Mitochondria-Associated Membranes: Composition, Molecular Mechanisms, and Physiopathological Implications. Antioxid. Redox Signal. *22*, 995–1019.

Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., and Gage, F.H. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. Cell *140*, 918–934.

Godar, R.J., Liu, H., and Diwan, A. (2012). Enhancing lysosome biogenesis attenuates BNIP3-induced cardiomyocyte death. Autophagy *8*, 297–309.

Gordon, S. (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Review. Immunity *44*, 463–475.

Görlach, A., and Bonello, S. (2008). The cross-talk between NF-κB and HIF-1 : further evidence for a significant. Biochem. J. *412*, 17–19.

Görlach, A., Dimova, E.Y., Petry, A., Martínez-Ruiz, A., Hernansanz-Agustín, P., Rolo, A.P., Palmeira, C.M., and Kietzmann, T. (2015). Reactive oxygen species , nutrition , hypoxia and diseases: Problems solved ? Redox Biol. *6*, 372–385.

Granato, M., Rizzello, C., Saveria, M., Montani, G., Cuomo, L., Vitillo, M., Santarelli, R., Gonnella, R., Orazi, G.D., Faggioni, A., et al. (2017). Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways. J. Nutr. Biochem. *41*, 124–136.

Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (1999). Mitochondrial Evolution. Science (80-.). *283*, 1476–1481.

Hall, A.R., Burke, N., Dongworth, R.K., and Hausenloy, D.J. (2014). Mitochondrial fusion and fission proteins : novel therapeutic targets for combating cardiovascular. Br. J. Pharmacol. *171*, 1890–1906.

Harbauer, A.B., Zahedi, R.P., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2014). The Protein Import Machinery of Mitochondria — A Regulatory Hub in Metabolism, Stress, and Disease. Cell Metab. *19*, 357–372.

Harris, J., Lang, T., Thomas, J.P.W., Sukkar, M.B., Nabar, N.R., and Kehrl, J.H. (2017). Autophagy and inflammasomes. Mol. Immunol.

Hartley, J.W., Evans, L.H., Green, K.Y., Naghashfar, Z., Macias, A.R., Zerfas, P.M., and Ward, J.M. (2008). Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells , a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. Retrovirology *5*, 6–11.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem. *13*, 572–584.

Hellwig, M., and Henle, T. (2014). Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. Angew. Chemie - Int. Ed. *53*, 10316–10329.

Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. Nature *444*, 860–867.

Hussein, S.Z., Yusoff, K.M., Makpol, S., and Yusof, Y.A.M. (2012). Gelam Honey Inhibits the Production of Proinflammatory , Mediators NO , PGE 2 , TNF- α , and IL-6 in Carrageenan-Induced Acute Paw Edema in Rats. Evidence-Based Complement. Altern. Med. *2012*.

Huynh, K.K., Eskelinen, E., Scott, C.C., Malevanets, A., Saftig, P., and Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. EMBO J. *26*, 313–324.

Ip, W.K.E., Hoshi, N., Shouval, D.S., Snapper, S., and Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. Science (80-.). *356*, 513 LP-519.

Iyer, S.S., He, Q., Janczy, J.R., Elliott, E.I., Zhong, Z., Olivier, A.K., Sadler, J.J., Knepper-adrian, V., Han, R., Qiao, L., et al. (2013). Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation. Immunity *39*, 311–323.

Jadot, M., Wattiaux-de Coninck, S., and Wattiaux, R. (1985). Effect on lysosomes of invertase endocytosed by rat-liver. Eur. J. Biochem. *151*, 485–488.

Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. Annu. Rev. Immunol. *20*, 197–216.

Juhas, U., Ryba-Stanislawowska, M., Szargiej, P., and Mysliwska, J. (2015). Different pathways of macrophage activation and polarization. Postepy Hig. Med. Dosw. *69*, 496–502.

Kabat, A.M., and Pearce, E.J. (2017). Inflammation by way of macrophage metabolism. Science (80-.). *356*, 0–2.

Kaddour-Djebbar, I., Choudhary, V., Brooks, C., Ghazaly, T., Lakshmikanthan, V., Dong, Z., and Kumar, M.V. (2010). Specific mitochondrial calcium overload induces mitochondrial fission in prostate cancer cells. Int. J. Oncol. *36*, 1437–1444.

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ. *18*, 571–580.

Keij, J.F., Bell-prince, C., and Steinkamp, J.A. (2000). Staining of Mitochondrial Membranes With 10-Nonyl Acridine Orange MitoFluor Green , and MitoTracker Green Is Affected by Mitochondrial Membrane Potential Altering Drugs. Cytometry *39*, 203–210.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, J., Abeliovich, H., Arozena, A.A., Adachi, H., Adams, M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy *12*, 1–222.

Korolchuk, V.I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F.H., Esteban, A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Fiona, M., et al. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. Nat. Cell Biol. *13*, 453–460.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen Recognition by the Innate Immune System. Int. Rev. Immunol. *30*, 16–34.

Kwakman, P.H.S., and Zaat, S.A.J. (2012). Critical Review : Antibacterial Components of Honey. Life *64*, 48–55.

Kwakman, P.H.S., Van den Akker, J.P.C., Güçlü, A., Aslami, H., Binnekade, J.M., de Boer, L., Boszhard, L., Paulus, F., Middelhoek, P., te Velde, A.A., et al. (2008). Medical Grade Honey Kills Antibiotic Resistant Bacteria In Vitro and Eradicates Skin Colonization. Clin. Infect. Dis. *46*, 1677–1682.

Kwakman, P.H.S., Velde, A.A., Boer, L. De, Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Zaat, S.A.J. (2010). How honey kills bacteria. FASEB J. *24*, 2576–2582.

Kwakman, P.H.S., De Boer, L., Ruyter-Spira, C.P., Creemers-Molenaar, T., Helsper, J.P.F.G.,

Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Zaat, S.A.J., and Te Velde, A.A. (2011a). Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *30*, 251–257.

Kwakman, P.H.S., te Velde, A.A., de Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Zaat, S.A.J. (2011b). Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. PLoS One *6*, 3–9.

De la Barrera, E., and Nobel, P.S. (2004). Nectar : properties , floral aspects , and speculations on origin. Trends Plant Sci. *9*, 65–69.

Labonte, A.C., Tosello-Trampont, A.-C., and Hahn, Y.S. (2014). The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. Mol. Cells *37*, 275–285.

Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 759–774.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. Cell *149*, 274–293.

Lee, J.E., Westrate, L.M., Wu, H., Page, C., and Voeltz, G.K. (2016). Multiple Dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. Nature *540*, 139–143.

Lee, S., Tak, E., Lee, J., Rashid, M.A., Murphy, M.P., Ha, J., and Kim, S.S. (2011). Mitochondrial H2O2 generated from electron transport chain complex I stimulates muscle differentiation. Cell Res. *21*, 817–834.

Lee, S.J., Evers, S., Roeder, D., Parlow, A.F., Risteli, J., Risteli, L., Lee, Y.C., Feizi, T., Langen, H., and Nussenzweig, M.C. (2002). Mannose Receptor – Mediated Regulation of Serum Glycoprotein Homeostasis. Science (80-.). *295*.

Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V.Z., and Folco, E. (2010). Inflammation in Atherosclerosis. Circ. J. *74*, 213–220.

Liu, M., Clarke, C.J., Salama, M.F., Choi, Y.J., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2017a). Co-ordinated activation of classical and novel PKC isoforms is required for PMA-induced mTORC1 activation. PLoS One *12*, 1–16.

Liu, Y., Huang, J., Zheng, X., Yang, X., Ding, Y., Fang, T., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, X., Luo, X., et al. (2017b). Luteolin , a natural flavonoid , inhibits methylglyoxal induced apoptosis via the mTOR/4E-BP1 signaling pathway. Sci. Rep. *7*, 1–11.

Long, A.T., Kenne, E., Jung, R., Fuchs, T.A., and Renné, T. (2016). Contact system revisited : an interface between inflammation , coagulation , and innate immunity. J. Thromb. Haemost. *14*, 427–437.

López-Armada, M.J., Riveiro-Naveira, R.R., Vaamonde-García, C., and Valcárcel-Ares, M.N. (2013). Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. Mitochondrion *13*, 106–118.

Lopez-Castejón, G., Baroja-Mazo, A., and Pelegrín, P. (2011). Novel macrophage polarization model: From gene expression to identification of new anti-inflammatory molecules. Cell. Mol. Life Sci. *68*, 3095–3107.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. *193*, 265–275.

Lübke, T., Lobel, P., and Sleat, D.E. (2009). Proteomics of the lysosome. Biochim. Biophys. Acta *1793*, 625–635.

Lüllmann-Rauch, R. (2005). History and Morphology of the Lysosome. Eurekah Biosci. *1*, 251–258.

Mahmoud, A.A., and Owayss, A.A. (2006). A modified method to determine hydrogen peroxide activity as a criterion for bee honey quality. Ann. Agric. Sci. *44*, 1629–1639.

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.

Medina, D.L., Paola, S. Di, Peluso, I., Armani, A., Stefani, D. De, Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-rosato, A., Prezioso, C., Settembre, C., et al. (2016). Lysosomal calcium signaling regulates autophagy via calcineurin and TFEB. Nat. Cell Biol. *17*, 288–299.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. Nature *454*, 428–435.

Michel, S., Wanet, A., De Pauw, A., Rommelaere, G., Arnould, T., and Renard, P. (2011). Crosstalk Between Mitochondrial (dys) Function and Mitochondrial Abundance. J. Cell. Physiol. *227*, 2297–2310.

Mills, E.L., and O'Neill, L.A. (2016). Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. Eur. J. Immunol. *46*, 13–21.

Mills, E.L., Kelly, B., and O'Neill, L.A.J. (2017). Mitochondria are the powerhouses of immunity. Nat. Immunol. *18*, 488–498.

Mindell, J.A. (2012). Lysosomal Acidification Mechanisms. Annu. Rev. Physiol. *74*, 69–86.

Missio da Silva, P., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Oliveira Costa, A.C., and Fett, R. (2016). Honey : Chemical composition , stability and authenticity. Food Chem. *196*, 309–323.

Molecular Probes Probes for Mitochondria. Mol. Probes Man. 473–488.

Molecular Probes Probes for Lysosomes, Yeast Vacuoles and Other Acidic Organelles. 489–496.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat. Rev. Immunol. *8*, 958–969.

Murray, P.J. (2017). Macrophage Polarization. Annu. Rev. Physiol. *79*, 541–566.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets. Nat. Rev. Immunol. *11*, 723–737.

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., et al. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. Cell Press Immun. Perspect. *41*, 14–20.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms : lessons from yeast. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 458–467.

Napolitano, G., and Ballabio, A. (2016). TFEB at a glance. J. Cell Sci. *129*, 2475–2481.

Nathan, C., and Ding, A. (2010). SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). Cell *140*, 8–10.

Nave, B.T., Ouwens, D.M., Withers, D.J., Alessi, D.R., and Shepherd, P.R. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of inslin and amino-acid deficiency on protein translation. Biochem. J. *344*, 427–431.

Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2013). Lehninger - Principles of Biochemistry - 6th edition.

Neurath, M.F. (2014). Cytokines in inflammatory bowel disease. Nat. Rev. Immunol. *14*, 329–342.

Nnah, I.C., Khayati, K., and Dobrowolski, R. (2015). Cellular metabolism and lysosomal mTOR signaling. J. Cell Death *1*, 11–22.

Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. J. Histochem. Cytochem. *1*, 188–211.

Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2014). Mitochondrial homeostasis : The interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. Exp. Gerontol. *56*, 182–188.

Pankiv, S., Clausen, P.H., Lamark, T., Brech, A., Bruum, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62 / SQSTM1 Binds Directly to Atg8 / LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates. *282*, 24131–24145.

Park, J., Choi, H., Min, J.-S., Park, S.-J., Kim, J.-H., Park, H.-J., Kim, B., Chae, J.-I., Yim, M., and Lee, D.-S. (2013). Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells. J. Neurochem. *127*, 221–232.

Pendergrass, W., Wolf, N., and Poot, M. (2004). Efficacy of MitoTracker Green ^{TM} and CMXRosamine to Measure Changes in Mitochondrial Membrane Potentials in Living Cells and Tissues. Cytometry *61*, 162–169.

Picard, M., Shirihai, O.S., Gentil, B.J., and Burelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? AJP Regul. Integr. Comp. Physiol. *304*, R393–R406.

Pireaux, V., Sauvage, A., Bihin, B., Van Steenbrugge, M., Rousseau, A., Van Antwerpen, P., Boudjeltia, K.Z., and Raes, M. (2016). Myeloperoxidase-Oxidized LDLs Enhance an Anti-Inflammatory M2 and Antioxidant Phenotype in Murine Macrophages. Mediators Inflamm. *2016*.

Pu, J., Kaplan, T.K., and Bonifacino, J.S. (2017). A Ragulator – BORC interaction controls lysosome positioning in response to amino acid availability. J. Cell Biol. 1–15.

Puente, C., Hendrickson, R.C., and Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. J. Biol. Chem. *291*, 6026–6035.

Rabinovitch, M. (1995). Professional and non-professional phagocytes : an introduction. Trends Cell Biol. *5*, 85–87.

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. Front. Immunol. *5*, 1–10.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-arencibia, M., Green-thompson, Z.W., Jimenez-sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. Physiol. Rev. *90*, 1383–1435.

Raynaud, A., Ghezali, L., Gloaguen, V., Liagre, B., Quero, F., and Petit, J.M. (2013). Honey-induced macrophage stimulation : AP-1 and NF- κ B activation and cytokine production are unrelated to LPS content of honey. Int. Immunopharmacol. *17*, 874–879.

Reddy, A., Caler, E. V, and Andrews, N.W. (2001). Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca2+-regulated Exocytosis of Lysosomes. Cell *106*, 157–169.

Reers, M., Smiley, S.T., Mottola-Hartshorn, C., Chen, A., Lin, M., and Chen, L.B. (1995). Mitochondrial Membrane Potential Monitored by JC-1 Dye. Biophys. Methods *260*, 406–417.

Ren, M., Phoon, C.K.L., and Schlame, M. (2014). Progress in Lipid Research Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. Prog. Lipid Res. *55*, 1–16.

Ricciotti, E., and FitzGerald, G.A. (2012). Prostaglandins and Inflammation. Artheriosclerosis, Thromb. Vasc. Biol. *31*, 986–1000.

Roczniak-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C., and Ferguson, S.M. (2012). The Transcription Factor TFEB Links mTORC1Signaling to Transcriptional Control of Lysosome Homeostasis. Sci. Signal. *5*.

Sagné, C., Agulhon, C., Ravassard, P., Hamon, M., Mestikawy, S. El, Gasnier, B., and Giros, B. (2001). Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. PNAS *98*, 3–8.

Saha, S. (2015). Honey-The natural sweetener become a promising alternative therapeutic: a review. South Indian J. Biol. Sci. *1*, 103–114.

Sancak, Y., Bar-peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2011). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. Cell *141*, 290–303.

Saric, A., Hipolito, V.E.B., Kay, J.G., Canton, J., Antonescu, C.N., and Botelho, R.J. (2016). mTOR controls lysosome tubulation and antigen presentation in macrophages and dendritic cells. Mol. Biol. Cell *27*, 321–333.

Scarpulla, R.C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. Biochim. Biophys. Acta *1813*, 1269–1278.

Senior, A.E. (1988). ATP Synthesis by Oxidative Phosphorylation. Physiol. Rev. *68*, 177–231.

Serhan, C.N., and Petasis, N.A. (2011). Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. Chem. Rev. *111*, 5922–5943.

Settembre, C., and Ballabio, A. (2011). TFEB regulates autophagy: An integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. Autophagy *7*, 1379–1381.

Settembre, C., and Ballabio, A. (2014). Lysosomal Adaptation : How the Lysosome REsponds to External Cues. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1–16.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., et al. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. EMBO J. *31*, 1095–1108.

Settembre, C., Polito, V.A., Garcia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., et al. (2013). TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. Sciencecience *332*, 1429–1433.

Shanmugam, N., Reddy, M.A., Guha, M., and Natarajan, R. (2003). High Glucose – Induced Expression of Proinflammatory Cytokine and Chemokine Genes in Monocytic Cells. Diabetes *52*, 1256–1264.

Shao, J., Zhang, A., Qin, W., Zheng, L., Zhu, Y., and Chen, X. (2012). AMP-activated protein kinase (AMPK) activation is involved in chrysin-induced growth inhibition and apoptosis in cultured A549 lung cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *423*, 448–453.

Shechter, R., and Schwartz, M. (2013). CNS sterile injury : just another wound healing ? Trends Mol. Med. *19*, 135–143.

Shimobayashi, M., and Hall, M.N. (2014). Making new contacts : the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 155–162.

Showkat, M., Beigh, M.A., and Andrabi, K.I. (2014). mTOR Signaling in Protein Translation Regulation : Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. Mol. Biol. Int. *2014*.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization : in vivo veritas. J. Clin. Invest. *122*, 787–795.

Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R., Youle, R.J., and Rizzuto, R. (2004). Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Calcium Waves and Protects against Calcium-Mediated Apoptosis. Mol. Cell *16*, 59–68.

Stephens, J.M., Schlothauer, R.C., Morris, B.D., Yang, D., Fearnley, L., Greenwood, D.R., and Loomes, K.M. (2010). Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. Food Chem. *120*, 78–86.

Stern, S.T., Adiseshaiah, P.P., and Crist, R.M. (2014). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. Part. Fibre Toxicol. *9*, 20–35.

Sukhorukov, V.M., and Meyer-Hermann, M. (2015). Structural Heterogeneity of Mitochondria Induced by the Microtubule Cytoskeleton. Nat. Sci. Reports *5*, 1–13.

Tang, T., Scambler, T.E., Smallie, T., Cunliffe, H.E., Ross, E.A., Rosner, D.R., Neil, J.D.O., and Clark, A.R. (2017). Macrophage responses to lipopolysaccharide are modulated by a feedback loop involving prostaglandin E 2 , dual specificity phosphatase 1 and tristetraprolin. Nat. Sci. Reports *2*, 1–13.

Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. Int. J. Biochem. Cell Biol. *36*, 2503–2518.

Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage Receptors and Immune Recognition. Annu. Rev. Immunol. *23*, 901–944.

Tonks, A.J., Cooper, R.A., Jones, K.P., Blair, S., Parton, J., and Tonks, A. (2003). Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. Cytokine *21*, 242–247.

Tschopp, J. (2011). Mitochondria : Sovereign of inflammation ? Eur. J. Immunol. *41*, 1196–1202.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int. J. Cancer *26*, 171–176.

Uhlik, M.T., Abell, A.N., Johnson, N.L., Sun, W., Cuevas, B.D., Lobel-Rice, K.E., Horne, E.A., Dell'Acqua, M.L., and Johnson, G.L. (2003). Rac–MEKK3–MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. Nat. Cell Biol. *5*, 1104–1110.

Ulrich, P., and Cerami, A. (2001). Protein Glycation, Diabetes, and Aging. Recent Prog. Horm. Res. *56*, 1–21.

Unanue, E.R. (1984). Antigen-presenting function of the macrophage. Annu. Rev. Immunol. *2*, 395–428.

Vallianou, N.G., Gounari, P., Skourtis, A., Panagos, J., and Kazazis, C. (2014). Honey and its Anti-inflammatory, Anti-bacterial and Anti-Oxidant Properties. Gen. Med. *2*.

Vannuvel, K., Van Steenbrugge, M., Ninane, N., Fattaccioli, A., Fransolet, M., Renard, P., Raes, M., and Arnould, T. (2015). Effects of a Sublethal and Transient Stress of the Endoplasmic Reticulum on the Mitochondrial Population. J. Cell. Physiol. *231*, 1913 1931.

Velnar, T., Bailey, T., and Smrkolj, V. (2009). The Wound Healing Process : an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. J. Int. Med. Res. *37*, 1528–1542.

Ventura-Clapier, R., Garnier, A., and Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis : the central role of PGC-1α. Cardiovasc. Res. *79*, 208–217.

Walther, D.M., and Rapaport, D. (2009). Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta *1793*, 42–51.

Weichhart, T., Hengstschläger, M., and Linke, M. (2015). Regulation of innate immune cell function by mTOR. Nat. Publ. Gr. *15*, 599–614.

Weng, C., Chau, C., Hsieh, Y., Yang, S., and Yen, G. (2008). Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK / ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF- k B and AP-1. Carcinogenesis *29*, 147–156.

Wenz, T. (2013). Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1α under cellular stress. Mitochondrion *13*, 134–142.

Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 872–884.

Wiedemann, N., Frazier, A.E., and Pfanner, N. (2004). The Protein Import Machinery of Mitochondria. J. Biol. Chem. *279*, 14473–14477.

Wilson-fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloro, S., Czech, M., and Corvera, S. (2003). Mitochondrial Biogenesis and Remodeling during Adipogenesis and in Response to the Insulin Sensitizer Rosiglitazone. Mol. Cell. Biol. *23*, 1085–1094.

Yaacob, N.S., and Ismail, N.F. (2014). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity of 4-hydroxytamoxifen in combination with Tualang honey in MCF-7 and MCF-10A cells. BMC Complement. Altern. Med. *14*, 106.

Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). Mammalian autophagy : core molecular machinery and signaling regulation. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 124–131.

Yao, Y., Chen, L., Xiao, J., Wang, C., Jiang, W., Zhang, R., and Hao, J. (2014). Chrysin protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice through attenuation of oxidative stress and inflammation. Int. J. Mol. Sci. *15*, 20913–20926.

Yen, W.-L., and Klionsky, D.J. (2008). How to Live Long and Prosper : Autophagy, Mitochondria, and Aging. Physiology *23*, 248–262.

Yoboue, E.D., and Devin, A. (2012). Reactive Oxygen Species-Mediated Control of Mitochondrial Biogenesis. Int. J. Cell Biol. *2012*.

Zhang, X., and Mosser, D. (2008). Macrophage activation by endogenous danger signals. J. Pathol. *144*, 161–178.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature *469*, 1–7.

Zinkernagel, R.M. (2003). On Natural and Artificial Vaccinations. Annu. Rev. Immunol. *21*, 515–546.

Zumla, A., and Lulat, A. (1989). Honey - a remedy rediscovered. J. R. Soc. Med. *82*, 384–385.