

[Télécharger le PDF](#)

Article en libre accès publié : 26 avril 2023

Une voie de signalisation du cuivre médicamenteuse qui provoque l'inflammation

[Stéphanie Solier](#), [Sebastian Müller](#), [Tatiana Cañeque](#), [Antoine Versini](#), [Arnaud Mansart](#), [Fabien Sindikubwabo](#), [Leeroy Baron](#), [Laila Emam](#), [Pierre Gestraud](#), [G. Dan Panto](#), [Vincent Gandon](#), [Christine Gaillet](#), [Ting-Di Wu](#), [Florent Dingli](#), [Damarys Loew](#), [Sylvain Baulande](#), [Sylvère Durand](#), [Valentin Sencio](#), [Cyril Robil](#), [François Trottein](#), [David Péricat](#), [Emmanuelle Näser](#), [Céline Cougoule](#), [Etienne Meunier](#), [Anne-Laure Bègue](#), [Hélène Salmon](#), [Nicolas Manel](#), [Alain Puisieux](#), [Sarah Watson](#), [Mark A. Dawson](#), [Nicolas Servant](#), [Guido Kroemer](#), [Djillali Annane](#) & [Raphaël Rodriguez](#)

[Afficher moins d'auteurs](#)[Nature](#) (2023)

9159 accède à 130 métriques Altmetric

Abstrait

L'inflammation est un processus physiologique complexe déclenché en réponse à des stimuli nocifs. Elle implique des cellules du système immunitaire capables d'éliminer les sources de blessures et les tissus endommagés. Une inflammation excessive peut survenir à la suite d'une infection et est une caractéristique de plusieurs maladies. Les bases moléculaires sous-jacentes aux réponses inflammatoires ne sont pas entièrement comprises. Ici, nous montrons que la glycoprotéine de surface cellulaire CD44, qui marque l'acquisition de phénotypes cellulaires distincts dans le contexte du développement, de l'immunité et de la progression du cancer, médie l'absorption de métaux, dont le cuivre. Nous identifions un pool de cuivre (II) chimiquement réactif dans les mitochondries des macrophages inflammatoires qui catalyse le cycle redox NAD(H) en activant peroxyde d'hydrogène. Le maintien du NAD permet des processus métaboliques et épigénétiques

programmation vers l'état inflammatoire. Cibler le cuivre mitochondrial(II) avec supformine (LCC-12), un dimère rationnellement conçu de la metformine, induit une réduction du pool de NAD(H), conduisant à des états métaboliques et épigénétiques qui s'opposent à l'activation des macrophages. Le LCC-12 interfère avec la plasticité cellulaire dans d'autres contextes et réduit l'inflammation dans des modèles murins d'infections bactériennes et virales. Notre Ces travaux mettent en évidence le rôle central du cuivre comme régulateur de la plasticité cellulaire et dévoilent une stratégie thérapeutique basée sur la reprogrammation métabolique et le contrôle des états cellulaires épigénétiques.

Principal

L'inflammation est un processus physiologique complexe qui permet l'élimination des agents pathogènes et la réparation des tissus endommagés. Cependant, une inflammation incontrôlée provoquée par les macrophages et d'autres cellules immunitaires peut entraîner des lésions tissulaires et une défaillance des organes. Les médicaments efficaces contre les formes sévères d'inflammation sont rares ^{5,6}, et il y a un besoin pour l'innovation thérapeutique. ⁷

La glycoprotéine de la membrane plasmique CD44 est le principal récepteur de surface cellulaire des hyaluronates. Il a été associé à des programmes biologiques impliquant ^{8,9,10} ¹¹ des cellules capables d'acquérir des phénotypes distincts indépendamment des altérations génétiques, qui est communément défini comme la plasticité cellulaire, ^{12,13}. Par exemple, inflammatoire les macrophages sont marqués par une expression accrue de CD44 et de son fonctionnement L'implication dans ce contexte a été démontrée. Cependant, les mécanismes par ^{14,15} dont le CD44 et les hyaluronates influencent la biologie cellulaire restent insaisissables. La découverte ^{14,16,17,18} récente que CD44 médie l'endocytose des hyaluronates liés au fer dans les cellules cancéreuses relie la biologie membranaire à la régulation épigénétique de la plasticité cellulaire, où l'augmentation de l'absorption du fer favorise l'activité des déméthylases dépendantes de l' α -cétoglutarate (α KG) impliquées dans la régulation de l'expression génique. ¹⁹

Il a été démontré que les hyaluronates induisent l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages alvéolaires (MA), et l'activation des macrophages repose sur ²⁰ mécanismes de régulation complexes se produisant au niveau de la chromatine. Ce corps de ^{21,22,23}

Les travaux soulèvent la question de savoir si un mécanisme général impliquant CD44-mediated l'absorption des métaux régule la plasticité et l'inflammation des macrophages.

Nous montrons ici que l'activation des macrophages est caractérisée par une augmentation de cuivre mitochondrial (II), qui se produit à la suite de la régulation à la hausse de CD44.

Le cuivre (II) mitochondrial catalyse le cycle redox du NAD (H), favorisant ainsi les changements métaboliques et les altérations épigénétiques qui en résultent qui conduisent à un état inflammatoire.

Nous avons développé un dimère de metformine qui inactive le cuivre(II) mitochondrial.

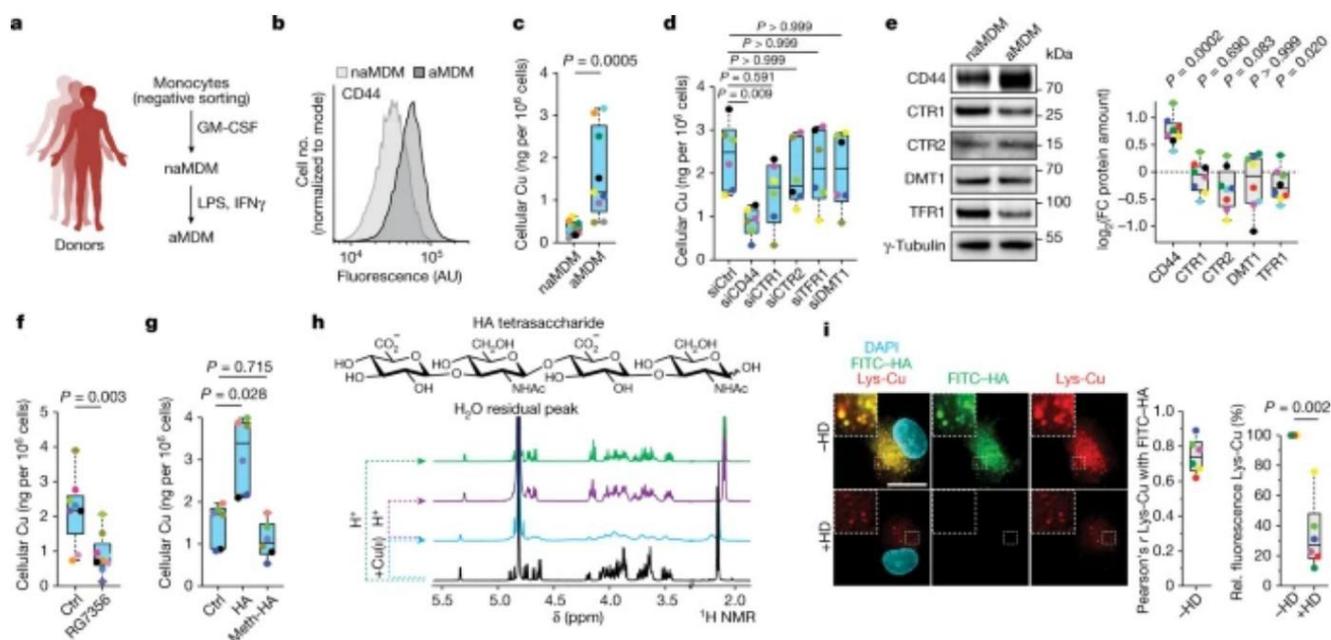
Ce médicament induit des changements métaboliques et épigénétiques qui s'opposent à l'activation des macrophages et atténuent l'inflammation in vivo.

CD44 médie l'absorption cellulaire du cuivre

Pour étudier le rôle des métaux dans l'activation des cellules immunitaires, nous avons généré des macrophages inflammatoires à l'aide de monocytes primaires humains isolés du sang (Fig. 1a).

Les macrophages activés dérivés de monocytes (aMDM) étaient caractérisés par la régulation à la hausse de CD44, CD86 et CD80, ainsi que par une morphologie cellulaire distincte (Fig. 1b et Extended Data Fig. 1a – c).

Fig. 1 : CD44 médie l'absorption du cuivre.



a, Configuration expérimentale utilisée pour générer des macrophages inflammatoires dérivés de monocytes (MDM). b, Cytométrie en flux de CD44 dans les MDM. Les données sont représentatives de n = 13 donneurs. UA, unités arbitraires. c, ICP-MS du cuivre cellulaire dans les MDM (n = 9 donneurs). d, ICP-MS de cuivre cellulaire dans des aMDM avec un court ARN interférent (siRNA) knockdown des récepteurs et transporteurs indiqués (n = 6 donneurs). Le transporteur de cuivre 1 (CTR1) est codé par SLC31A1, le CTR2 est codé par SLC31A2, le récepteur 1 de la transferrine (TFR1) est codé par TFRC et le métal divalent

transporteur 1 (DMT1) est codé par SLC11A2. siCtrl, contrôler l'ARNsi. e, Western blots représentatifs des transporteurs de métaux dans les MDM (n = 7 donneurs). FC, changement de pli. f, ICP-MS du cuivre cellulaire dans les MDM traités avec l'anticorps anti-CD44 RG7356 lors de l'activation (n = 7 donneurs). g, ICP-MS de cuivre cellulaire dans les MDM traités au hyaluronate (0,6–1 MDa) (HA) ou hyaluronate perméthylé (meth-HA) pendant l'activation (n = 6 donneurs). h, moléculaire structure du tétrasaccharide hyaluronate (en haut) et spectres RMN ^1H (en bas) du cuivre–Expérience de complexation d'hyaluronate, enregistrée à 310 K en D O. i, Microscopie à fluorescence d'une sonde lysosomale de cuivre (II) (Lys-Cu) et de FITC–hyaluronate dans des aMDM traités à la hyaluronidase (HD). Au moins 30 cellules ont été quantifiées par donneur (n = 6 donneurs). Barre d'échelle, 10 μm . Rel., relatif. c,e,f,i, Test de Mann–Whitney bilatéral. d,g, test de Kruskal-Wallis avec post-test de Dunn. Dans toutes les boîtes à moustaches des figures principales, les boîtes représentent l'intervalle interquartile, les lignes centrales représentent les médianes et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Dans les graphiques, chaque point coloré représente un donneur individuel pour un panel donné.

[Données source](#)

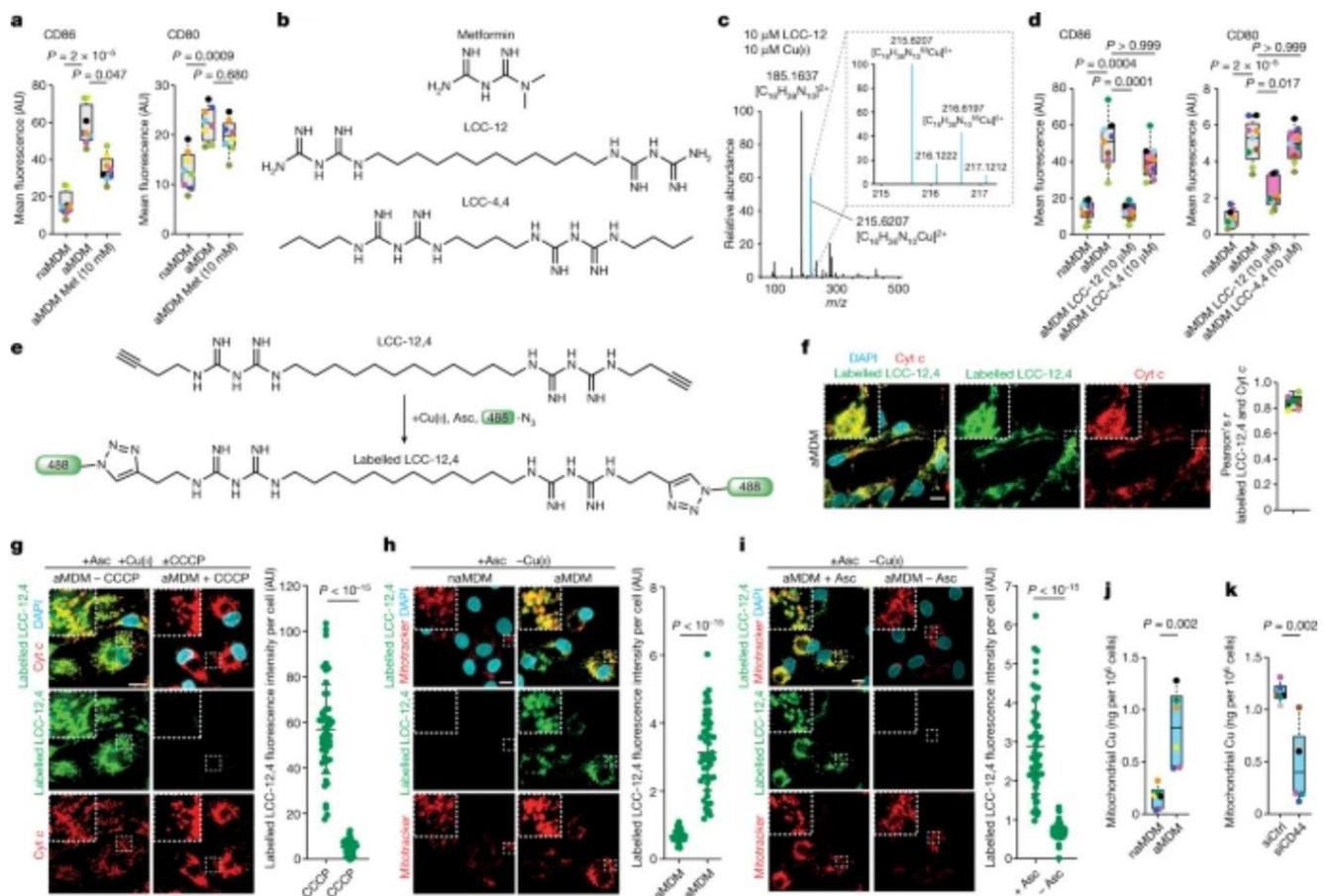
En utilisant la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS), nous avons détecté des niveaux cellulaires de cuivre, de fer, de manganèse et de calcium dans les aMDM par rapport aux non MDM activés (naMDM) (Fig. 1c et Extended Data Fig. 1d). Contrairement à d'autres transporteurs de métaux, la suppression de l'absorption de métal antagoniste du CD44 (Fig. 1d et Données étendues Fig. 1e, f) et, contrairement au CD44, les niveaux de ces autres transporteurs de métaux n'ont pas augmenté lors de l'activation des macrophages (Fig. 1e). Il convient de noter que les niveaux de ces transporteurs sont restés inchangés dans des conditions de knock-down de CD44 (Extended Data Fig. 1g). Le traitement des MDM avec un anticorps anti-CD44 a antagonisé l'absorption de métal lors de l'activation (Fig. 1f et Extended Data Fig. 2a). Inversement, la supplémentation des cellules avec de l'hyaluronate lors de l'activation a augmenté l'absorption de métal, tandis que l'ajout d'un hyaluronate perméthylé, qui est moins sujet à la liaison au métal, n'a eu aucun effet (Fig. 1g et Extended Data Fig. 2b). Les macrophages inflammatoires ont également été caractérisés par la régulation à la hausse des hyaluronate synthases (HAS) et la régulation à la baisse de la protéines d'exportation de cuivre ATP7A et ATP7B (données étendues Fig. 2c). Magnétique nucléaire La résonance a révélé que l'hyaluronate interagit avec le cuivre (II) et que cette interaction peut être inversée en abaissant le pH (Fig. 1h). La microscopie à fluorescence a montré que l'hyaluronate marqué était colocalisé avec une sonde de cuivre (II) lysosomale dans les aMDM (Fig. 1i). Cotraitement avec hyaluronidase - qui dégrade les hyaluronates - ou

abatte CD44 a réduit la coloration lysosomale au cuivre (II) (Fig. 1i et Extended Données Fig. 2d). Dans les aMDM, le transporteur de cuivre CTR2 s'est colocalisé avec le marqueur endolysosomal LAMP2 et l'inactivation de CTR2 a entraîné une augmentation de la coloration lysosomale du cuivre (II) (données étendues Fig. 2e, f). Collectivement, ces données indiquent que dans les aMDM, CD44 médie l'endocytose de métaux spécifiques liés à l'hyaluronate, y compris le cuivre.

Le Cu(II) mitochondrial régule la plasticité cellulaire

Nous avons évalué la capacité des chélateurs de cuivre (I) et de cuivre (II), y compris l'ammonium tétrathiomolybdate (ATTM), D-pénicillamine (D-Pen), EDTA et trientine pour interférer avec l'activation des macrophages. Nous avons également étudié la metformine, un biguanide utilisé pour le traitement du diabète de type 2, car il peut former un complexe bimoléculaire avec le cuivre(II). La metformine a partiellement antagonisé la régulation à la hausse de CD86, bien qu'à des concentrations élevées, contrairement aux effets marginaux d'autres molécules ciblant le cuivre (Fig. 2a et Extended Data Fig. 3a).

Fig. 2 : Développement d'une petite molécule inactivatrice des mitochondries cuivre(II).



a, Cytométrie en flux des marqueurs de surface cellulaire dans les MDM traités à la metformine (Met) (n = 8 donateurs). b, Structures moléculaires de la metformine, LCC-12 et LCC-4,4. c, HRMS d'un Cu – LCC-12 complexe. d, cytométrie en flux des marqueurs de surface cellulaire dans les MDM traités avec LCC-12 ou LCC-4,4 (n = 9 donneurs). e, Procédure expérimentale de marquage dans la cellule de LCC-12,4. f, fluorescence microscopie de LCC-12,4 marqué dans des aMDM (n = 6 donneurs). Au moins 50 cellules ont été quantifiées par donateur. Cyt c, cytochrome c. g, microscopie à fluorescence de LCC-12,4 marqué dans des aMDM traité avec CCCP. h, Microscopie à fluorescence de LCC-12,4 marqué dans les MDM. En cellule le marquage est réalisé avec de l'ascorbate et sans cuivre(II) ajouté. i, microscopie à fluorescence de LCC-12,4 marqué dans des aMDM. Le marquage in-cell est réalisé en présence ou en l'absence d'ascorbate (asc) et sans ajout de cuivre(II). j, ICP-MS du cuivre mitochondrial dans les MDM (n = 6 donneurs). k, ICP-MS de cuivre mitochondrial dans des aMDM dans des conditions d'inactivation de CD44 (n = 6 donneurs). g–i, test t bilatéral non apparié, représentatif de n = 3 donneurs. Les données sont moyennes \pm sd a,d, test de Kruskal-Wallis avec post-test de Dunn. j,k, Test de Mann–Whitney bilatéral. Dans les graphiques, chaque point coloré représente un donateur individuel pour un panel donné. Barres d'échelle, 10 μ m.

[Données source](#)

Pour réduire le coût entropique inhérent à la formation de complexes bimoléculaires $\text{Cu}(\text{Met})_2$, nous avons ^{27,28} attaché deux biguanides avec des lieurs contenant du méthylène à produire les pinces de cuivre lipophiles LCC-12 et LCC-4,4 (Fig. 2b), qui contiennent 12 et 4 groupes méthylène de liaison, respectivement. LCC-4,4 affiche des substituants butyle distaux pour présenter une lipophilie similaire à celle de LCC-12. Nous avons comparé structures simulées de complexes de cuivre(II) avec les plus faibles énergies en utilisant dynamique moléculaire et transformée de Fourier discrète avec un complexe $\text{Cu}(\text{Met})$ en utilisant la structure cristalline de ce dernier comme référence (Extended Data Fig. 3b). ²⁸ Cu-LCC-12 a adopté une géométrie similaire à celle de $\text{Cu}(\text{Met})$, tandis que Cu-LCC-4,4 manquait de symétrie d'angle de liaison et présentait des liaisons imine–cuivre hors du plan. L'énergie libre calculée de Cu-LCC-4,4 était supérieure de 16,6 kcal mol⁻¹ à celle de Cu-LCC-12 , ce qui suggère que Cu-LCC-4,4 est un complexe de cuivre(II) moins stable. La spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) a confirmé la formation de complexes monométalliques de biguanide de cuivre, le Cu-LCC-12 étant le plus stable (Fig. 2c et Extended Data Fig. 3c). Cu-LCC-12 n'a pas formé de complexes stables avec d'autres ions métalliques divalents (Extended Data figure 3d). Une réduction de l'absorbance UV du LCC-12 lors de l'ajout de cuivre (II)

le chlorure a indiqué la formation d'un complexe à de faibles concentrations micromolaires. C'était confirmé par l'apparition de solutions colorées caractéristiques des complexes métalliques (données étendues Fig. 3e, f). Notamment, même à une dose 1 000 fois plus faible, le LCC-12 a antagonisé l'induction de CD86 et CD80 dans les aMDM plus puissamment que la metformine (Fig. 2d). L'effet du LCC-4,4 utilisé à 10 μ M était modéré, cohérent avec la capacité réduite de cet analogue à former un complexe avec le cuivre(II). Comme indiqué pour une concentration plus faible de metformine, ce qui suggère que les phénotypes induits par la metformine sont liés au 29, LCC-12 a induit la phosphorylation de l'AMPK, bien qu'à un ciblage du cuivre (II) (Extended Data Fig. 3g).

—

Ensuite, nous avons évalué l'effet de LCC-12 sur d'autres types de cellules qui peuvent réguler positivement CD44 lors de l'exposition à des stimuli biochimiques spécifiques. LCC-12 a interféré avec l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T et l'expression de plusieurs surfaces cellulaires moléculaires sur des macrophages activés alternativement (données étendues Fig. 4a, b). Par — — En revanche, LCC-12 n'a pas interféré avec l'activation des neutrophiles, un processus qui n'est pas marqué par une régulation positive de CD44. La signalisation en cuivre a déjà été liée à les cellules 30,31,32. Cellules de carcinome pulmonaire humain non à petites cellules et souris d'adénocarcinome pancréatique de progression du cancer subissant une transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) - un programme de biologie cellulaire qui peut favoriser l'acquisition de l'état persistant des cellules cancéreuses et des métastases - ont été caractérisées par une régulation à la hausse de CD44 et une augmentation du cuivre cellulaire. De manière constante, LCC-12 a interféré avec l'EMT, comme le montrent les niveaux du marqueur épithélial E-cadhérine, des marqueurs mésenchymateux vimentine et fibronectine, les facteurs de transcription EMT Slug et Twist ainsi que les niveaux de protéine métastatique CD109 (données étendues Fig. 4c, d). Ces données soutiennent un mécanisme général impliquant le cuivre qui régule la plasticité cellulaire.

Imagerie par spectrométrie de masse à ions secondaires à l'échelle nanométrique (NanoSIMS) des aMDM a révélé une localisation subcellulaire de l'isotopologue N, C-LCC-12 qui chevauchait les signaux du cytochrome c marqué à l'Au, suggérant que 15 13 LCC-12 cible les mitochondries (Extended Data Fig. 5a, b). Marquage fluorescent des cellules — — l'analogue biologiquement actif LCC-12,4 contenant du but-1-yne utilisant la chimie du clic a donné lieu à un 34 motif de coloration cytoplasmique qui s'est colocalisé avec le cytochrome c (Fig. 2e, f). La coloration mitochondriale de LCC-12,4 a été réduite lors du cotraitement avec

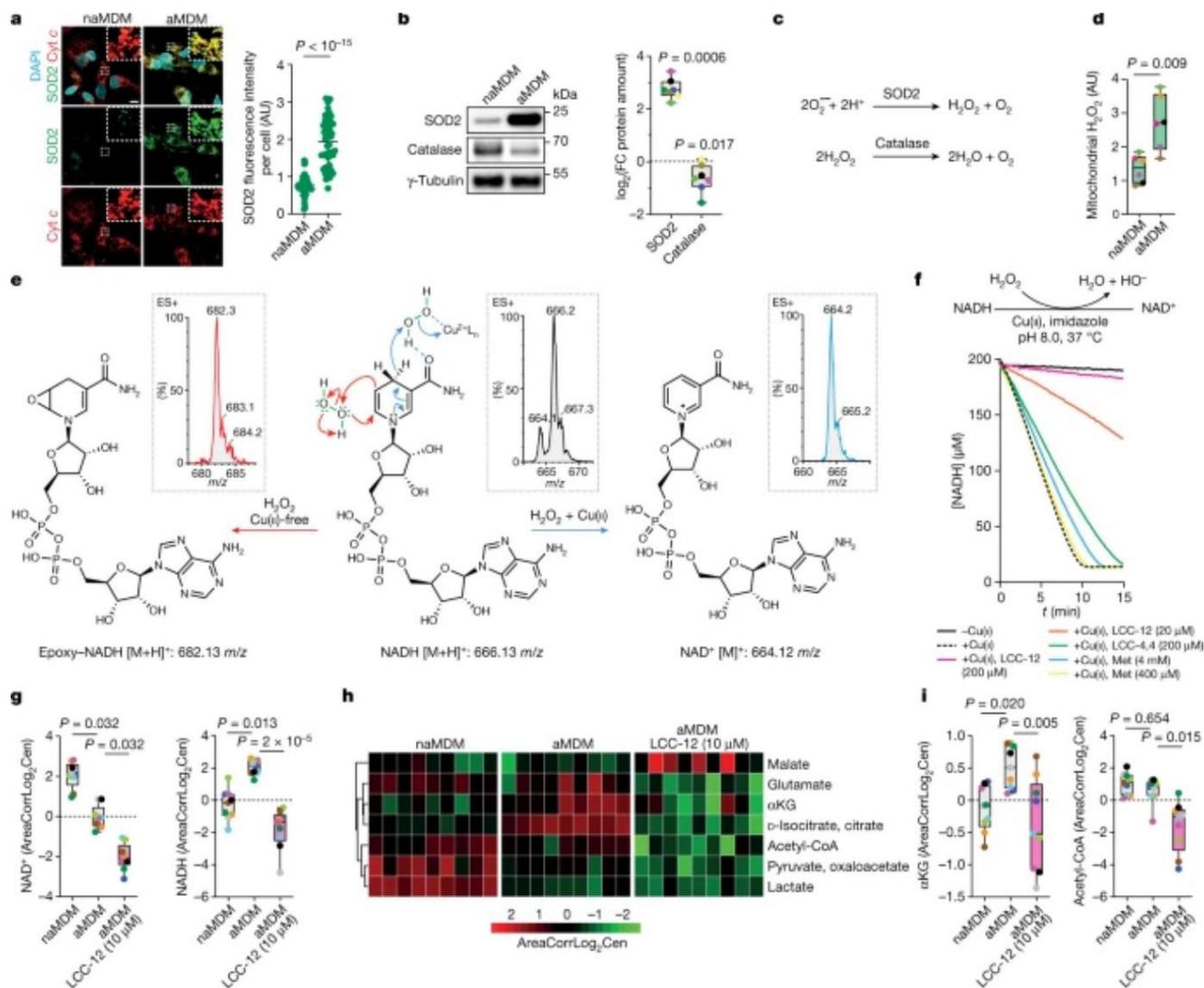
cyanure de carbonyle chlorophénylhydrazone (CCCP), une petite molécule qui se dissipe le gradient de protons mitochondrial interne, indiquant que l'accumulation de LCC-12 dans les mitochondries est déterminée par son état de protonation (Fig. 2g). Le marquage de petites molécules contenant des alcynes dans les cellules nécessite un catalyseur de cuivre (I) généré in situ à partir de cuivre (II) et d'ascorbate ajoutés. Nous avons cherché à savoir si la teneur en cuivre (II) mitochondrial des aMDM permettrait un marquage dans la cellule sans qu'il soit nécessaire d'ajouter expérimentalement un catalyseur au cuivre. Le marquage fluorescent du LCC-12,4 utilisé à une concentration de 100 nM, qui est inférieure à la dose biologiquement active de LCC-12, s'est produit dans les aMDM en l'absence de cuivre (II) ajouté et une forte coloration n'a été observée que dans les aMDM lorsque l'ascorbate a été utilisé pour le marquage (Fig. 2h, i). De plus, l'intensité de fluorescence du LCC-12,4 marqué a été réduite lorsqu'un excès molaire de 100 fois de LCC-12 a été utilisé comme compétiteur. Ces données confirment l'existence d'un pool de médicaments réactifs chimiquement cuivre(II) dans les mitochondries. Conformément à cela, les niveaux de cuivre ont augmenté dans les mitochondries lors de l'activation des macrophages avec ceux du manganèse (Fig. 2j) et données étendues Fig. 5d, e), tandis que les niveaux de cuivre dans le réticulum endoplasmique et le noyau sont restés inchangés (données étendues Fig. 5f, g). Notamment, les aMDM étaient caractérisés par une augmentation du fer nucléaire, suggérant une activité accrue des déméthylases dépendantes de l' α KG, comme indiqué précédemment dans les cellules cancéreuses subissant une EMT (Extended Data Fig. 5f). Le traitement au LCC-12 n'a pas modifié la teneur totale en cuivre cellulaire et mitochondrial des aMDM, ce qui indique que le LCC-12 n'agit pas comme un cuprophore. En revanche, LCC-12 a réduit la fluorescence d'une sonde de cuivre (II) mitochondriale dans les aMDM, soutenant la liaison directe du cuivre dans les mitochondries (Extended Data Fig. 5j). Notamment, les transporteurs de métaux mitochondriaux SLC25A3 et SLC25A37 ont été régulés à la hausse dans les aMDM (Extended Data Fig. 5k). La suppression de l'expression de ces transporteurs ou de CD44 n'a pas réduit la fluorescence du LCC-12,4 marqué (Extended Data Fig. 5l – n), alors que la suppression de CD44 a entraîné une réduction marquée du cuivre mitochondrial (Fig. 2k). Cela indique que, contrairement au gradient de protons, le cuivre mitochondrial ne conduit pas à l'accumulation mitochondriale de biguanides. Comme contrôle, le marquage d'un dérivé contenant un alcyne de la trientine chélatrice du cuivre(II), qui n'a pas montré d'effet puissant contre l'activation des macrophages, a révélé une accumulation nucléaire, expliquant l'absence de

activité biologique de ce médicament et potentiellement d'autres médicaments ciblant le cuivre dans ce contexte (Données étendues Fig. 5o,p). _

Le Cu(II) régule le cycle redox du NAD(H)

Des niveaux mitochondriaux plus élevés de manganèse dans les aMDM ont mis en évidence un rôle fonctionnel de la superoxyde dismutase 2 (SOD2) dans le contexte de l'activation des macrophages. La quantité de protéine SOD2 a augmenté dans les mitochondries lors de l'activation, tandis que la quantité de catalase a diminué (Fig. 3a, b). Le peroxyde d'hydrogène mitochondrial, un produit de la superoxyde dismutase et substrat de la catalase, augmenté en conséquence (Fig. 3c,d). Dans les systèmes sans cellule, le cuivre (II) peut catalyser la réduction de l'hydrogène le peroxyde par divers substrats organiques mis à 40,41. En présence de cuivre(II), NADH réagir avec du peroxyde d'hydrogène pour donner du NAD⁺, alors que l'absence de cuivre(II) a donné un mélange complexe de produits d'oxydation (Fig. 3e et Extended Data Fig. 6a). De manière constante, le cuivre (II) a favorisé la conversion du 1-méthyl-1,4-dihyronicotinamide (MDHNA), un substitut structurellement moins complexe du NADH, en 1-méthylnicotinamide (MNA), alors qu'un produit d'époxydat⁺ion s'est formé préférentiellement en l'absence de cuivre (Extended Data Fig. 6b,c). Ainsi, le cuivre(II) redirige la réactivité du peroxyde d'hydrogène vers le NADH. En réaction des conditions similaires à celles trouvées dans les mitochondries, le NADH a été rapidement consommé pour produire⁺du NAD en présence de cuivre (II) (Fig. 3f et Extended Data Fig. 6d). Cette réaction a été inhibée par le LCC-12, alors que les effets du LCC-4,4 et de la metformine ont été marginal(Fig. 3f). La modélisation moléculaire a soutenu un mécanisme de réaction dans lequel le cuivre (II) active le peroxyde d'hydrogène, facilitant sa réduction par le transfert d'un hydrure de NADH (Extended Data Fig. 6e). Le cuivre(II) agit comme un catalyseur qui abaisse l'énergie de l'état de transition avec une géométrie favorisant cette réaction. La modélisation moléculaire a également soutenu l'inactivation de cette réaction par les biguanides par liaison directe au cuivre (II) (Extended Data Fig. 6f).

Fig. 3 : Le cuivre mitochondrial(II) régule le cycle redox du NAD(H).



a, Microscopie à fluorescence de SOD2 dans les MDM. Représentant de n = 4 donneurs. Au moins 50 cellules ont été quantifiées par donneur. Barre d'échelle, 10 μ m. Test t non apparié bilatéral. Les données sont moyennes \pm sd

b, Western blots représentatifs de la SOD2 et de la catalase dans les MDM (n = 7 donneurs).

c, Régulation des niveaux de HO par SOD2 et catalase.

d, Cytométrie en flux de HO mitochondriale dans les MDM (n = 6 donneurs).

e, Réaction du NADH avec H₂O dans des conditions catalysées au cuivre (II) ou sans cuivre. Les pics de spectrométrie de masse expérimentale et les masses calculées d'ions moléculaires sont indiqués. ES+, spectrométrie de masse à ionisation électrospray.

f, Cinétique de l'oxydation du NADH en présence de HO et de cuivre(II). Les données sont représentatives de n = 3 expériences indépendantes.

g, Métabolomique du NAD et du NADH des mitochondries de MDM traités avec LCC-12 (n = 9 donneurs). Les données AreaCorrLog₂Cen correspondent aux zones brutes, corrigées du biais analytique à l'aide du package GRMeta R, puis les zones corrigées sont transformées en log et centrées sur les moyennes.

h, Carte thermique métabolomique mettant en évidence les métabolites dont la biosynthèse est dépendante du NAD(H) dans les MDM traités au LCC-12 (n = 9 donneurs).

i, Métabolomique de l' α KG et de l'acétyl-CoA des MDM traités au LCC-12 (n = 9 donneurs).

b,d, Test de Mann–Whitney bilatéral. g,i, test de Kruskal–Wallis avec post-test de Dunn. Dans les graphiques, chaque le point coloré représente un donneur individuel pour un panel donné.

Les niveaux de NADH mitochondrial étaient plus élevés et les niveaux de NAD étaient plus faibles dans les aMDM que dans les naMDM, ce qui suggère une activité accrue des enzymes mitochondriales dépendantes du NAD (Fig. 3g et tableau supplémentaire 1). Le traitement des MDM avec LCC-12 pendant l'activation a entraîné une réduction de NADH et du NAD (Fig. 3g et tableau supplémentaire 1). Cela suggère que le cuivre (II) catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène par le NADH pour produire du NAD et que les biguanides peuvent interférer avec ce cycle redox, conduisant à la place à d'autres sous-produits d'oxydation (Fig. 3e). Le NADH et le cuivre étaient trouvés dans les mitochondries des aMDM à un rapport substrat: catalyseur estimé de 2: 1, ce qui est encore plus favorable pour que cette réaction ait lieu que le rapport 20: 1 utilisé dans le système sans cellule (Extended Data Fig. 6g). L'activation des macrophages a été accompagné de niveaux altérés de plusieurs métabolites dont la production dépend de NAD(H) (Fig. 3h et Tableau supplémentaire 2). La reprogrammation métabolique induite par le LCC-12 des aMDM a été marquée par une réduction de l' α KG et de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) (Fig. 3i). Le LCC-12 a également provoqué une réduction du lactate extracellulaire et une accumulation de glycéraldéhyde 3-phosphate dans les aMDM, ce qui correspond à l'activité réduite de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase dépendante du NAD (données étendues Fig. 6h, i). Ensemble, ces données soutiennent le rôle central du cuivre (II) mitochondrial dans le maintien d'un pool de NAD qui régule l'état métabolique des macrophages inflammatoires.

Le Cu(II) mitochondrial régule la transcription

La transcription est co-régulée par des enzymes modificateuses de la chromatine, dont les niveaux d'expression et le recrutement à des locus génomiques spécifiques façonnent l'expression des gènes. Le renouvellement d'enzymes spécifiques telles que les déméthylases fer-dépendantes et les acétyltransférases repose sur l' α KG et l'acétyl-CoA. La découverte selon laquelle LCC-12 interférait avec la production de ces métabolites et s'opposait à l'activation des macrophages indiquait des altérations épigénétiques qui affectent l'expression des gènes inflammatoires. Nous avons analysé les transcriptomes des aMDMs versus ceux des naMDMs par séquençage d'ARN (RNA seq) (tableau supplémentaire 3) et les a comparés aux données transcriptomiques obtenues à partir de macrophages bronchoalvéolaires d'individus infectés par une maladie aiguë sévère.

coronavirus du syndrome respiratoire 2 (SRAS-CoV-2) et des ⁴³macrophages humains exposés in vitro à Salmonella typhimurium, ⁴⁴ Leishmania major ou ⁴⁵Aspergillus fumigatus (tableau ⁴⁶supplémentaire 4). L'analyse de l'ontologie génique (GO) a révélé trois groupes de termes GO comprenant des gènes régulés positivement, appartenant à l'inflammation, au métabolisme et à la chromatine (Fig. 4a). Notamment, les termes GO de ces gènes comprenaient le transport endosomal, la réponse cellulaire à l'ion cuivre, la réponse au peroxyde d'hydrogène et la régulation positive de l'organisation des mitochondries. Des signatures similaires ont été obtenues pour les macrophages exposés à des agents pathogènes distincts (données étendues Fig. 7a, b et tableau supplémentaire 5), tels que définis par les termes GO et des quantités d'ARN accrues pour les gènes impliqués dans l'inflammation (Fig. 4b et données étendues Fig. 7c). Les aMDM présentaient des gènes régulés à la hausse codant pour le CD44, le tri de la nexine 9 (SNX9), un régulateur de l'endocytose du CD44, et des métallothionéines (MT2A et MT1X) impliquées dans le transport et le stockage du cuivre, alors que les niveaux d'expression d'ATP7A et d'ATP7B étaient régulés à la baisse (tableau supplémentaire 3). Les gènes impliqués dans les modifications de la chromatine et des histones ont été régulés positivement dans les aMDM et des gènes similaires codant pour les déméthylases et les acétyltransférases dépendantes du fer ont été régulés positivement dans les macrophages bronchoalvéolaires d'individus infectés par le SRAS-CoV-2, ainsi que dans les macrophages exposés à d'autres agents pathogènes (Fig. 4c et Extended Données Fig. 7d). Ces données indiquent que des classes distinctes d'agents pathogènes déclenchent des réactions épigénétiques similaires, ⁴⁷ modifications, conduisant à l'état cellulaire inflammatoire. Dans les aMDM, les variations de protéines niveaux, y compris des augmentations des déméthylases et des acétyltransférases dépendantes du fer étaient cohérents avec les données RNA-seq (Extended Data Fig. 8a, b et Supplémentary Tableau 6). Les changements dans les niveaux de déméthylases et d'acétyltransférases spécifiques étaient associés à des altérations de leurs marques ciblées (données étendues Fig. 8c, d). Le séquençage d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-seq) a révélé une augmentation globale des marques acétyl permissives H3K27ac, H3K14ac et H3K9ac ainsi qu'une réduction des marques méthyl répressives H3K27me3 et H3K9me2 au niveau des locus de gènes inflammatoires, avec des effets constants sur le profil transcriptionnel des aMDM (Fig. 4d, Données étendues Fig. 8e, f et tableau supplémentaire 7). Le traitement au LCC-12 a induit une régulation à la baisse des gènes liés au métabolisme du NAD (H) et de l' α KG, à la régulation de la chromatine et de l'inflammation (Fig. 4e et Tableau supplémentaire 8). L'inactivation du cuivre (II) mitochondrial a également favorisé la régulation à la baisse des gènes inflammatoires aux niveaux de l'ARN et des protéines (Fig. 4f, Extended Data Fig. 9a, b et Supplémentaire _____

Tableau 3), reflétant une reprogrammation épigénétique complexe vers un état cellulaire distinct (Données étendues Fig. 9c). Le traitement au LCC-12 a réduit H3K27ac, H3K14ac et H3K9ac et augmenté les niveaux de H3K27me3 et H3K9me2 (données étendues Fig. 9d), ce qui était associé à la régulation à la baisse des gènes inflammatoires ciblés (Fig. 4g, données étendues Fig. 9e, f et tableau supplémentaire 7). Ainsi, les diminutions induites par LCC-12 de l' α KG et de l'acétyl-CoA étaient associées à une activité réduite des déméthylases et des acétyltransférases dépendantes du fer, respectivement. Notamment, la suppression de l'expression de SOD2 ou du transporteur de cuivre mitochondrial SLC25A3 a réduit la signature inflammatoire des macrophages (Extended Data Fig. 9g, h). De même, l'élimination de CD44 a contrarié la programmation épigénétique de l'inflammation dans les aMDM sans nuire à l'expression d'autres transporteurs de métaux (Fig. 4h, Données étendues Fig. 9i – k et Tableau supplémentaire 9). Ensemble, ces données indiquent que le peroxyde d'hydrogène est un moteur de la plasticité cellulaire et que le cuivre mitochondrial(II) contrôle la disponibilité des intermédiaires métaboliques essentiels nécessaires à l'activité des enzymes de modification de la chromatine, ce qui permet des changements transcriptionnels rapides sous-jacents à l'acquisition d'états cellulaires distincts.

Fig. 4 : Le cuivre(II) mitochondrial régule les états épigénétiques et les programmes transcriptionnels des macrophages inflammatoires.

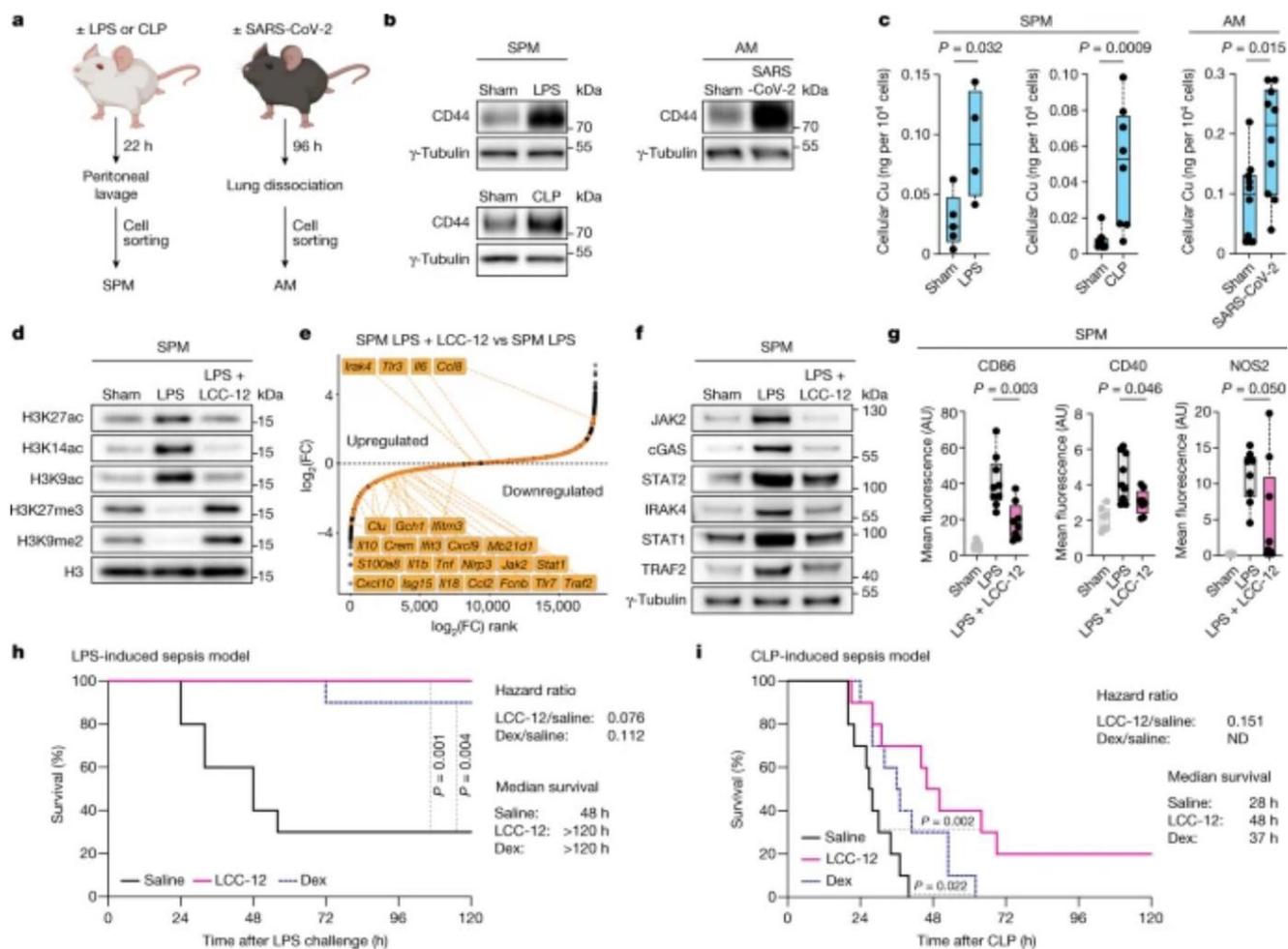
clusterProfiler. Les valeurs P ont été corrigées pour les tests multiples avec la procédure Benjamini-Hochberg.

L'inactivation du Cu(II) réduit l'inflammation

Nous avons étudié le rôle de la signalisation du cuivre dans des modèles murins bien établis d'inflammation aiguë : (1) endotoxémie induite par le lipopolysaccharide (LPS), reflétant notre modèle mécaniste d'activation des macrophages ; (2) ligature et ponction cœcales (CLP), qui récapitule la physiopathologie des polymicrobiens subaigus septicémie abdominale survenant chez l'homme ; ⁴⁸ (3) un modèle d'infection virale, à savoir SRAS-CoV-2. Les états inflammatoires des petits macrophages péritonéaux (SPM) isolés à partir de modèles de souris LPS et CLP, et AM isolés à partir de modèles infectés par le SRAS-CoV-2 souris, ont été caractérisées par un CD44 régulé à la hausse et une augmentation du cuivre cellulaire (Fig. [5a – c](#)). Les effecteurs de la voie de signalisation du cuivre, y compris HAS et SOD2 ainsi que des modificateurs épigénétiques spécifiques, ont également été régulés à la hausse dans les macrophages inflammatoires (données [étendues](#) Fig. [10a – c](#)). Les cibles de marque d'histone de ces modificateurs épigénétiques ont été modifiées [en](#) conséquence (Fig. [5d](#) et [Extended Data Fig. 10b, c](#)). Intrapéritonéale l'administration de LCC-12 chez des souris traitées au LPS a entraîné des réductions de H3K27ac, H3K14ac et H3K9ac et des augmentations de H3K27me3 et H3K9me2 (Fig. [5d](#)), qui ont [été](#) associée à une inflammation réduite (Fig. [5e – g](#) et [tableau supplémentaire 10](#)). Conformément à [ce](#) résultat, l'administration intrapéritonéale de souris LCC-12 entièrement protégées de la mort induite par le LPS et a empêché la réduction de la température corporelle (Fig. [5h](#) et [Extended Data Fig. 10d](#)), [plus](#) [performant](#) que la dexaméthasone à forte dose, qui est utilisée pour la prise en charge clinique de l'inflammation aiguë. Dans la septicémie induite par le CLP, le LCC-12 a également augmenté le taux de survie (Fig. [5i](#)). Le LCC-12 [administré](#) par inhalation à des souris K18-hACE2 infectées par le SRAS-CoV-2 a modifié l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la chromatine et a régulé à la baisse l'expression de gènes inflammatoires (données [étendues](#) Fig. [10e, f](#) et [tableaux](#) supplémentaires [11](#) et [12](#)).

Ensemble, ces données indiquent que le ciblage du cuivre (II) mitochondrial interfère avec l'acquisition de l'état inflammatoire in vivo et confère des avantages thérapeutiques.

Fig. 5 : Inactivation pharmacologique des atténuateurs de cuivre(II) mitochondrial inflammation in vivo.



a, Configuration expérimentale pour isoler les SPM et les AM. La stratégie de déclenchement est indiquée dans les [informations supplémentaires](#). b, Western blots de CD44 dans des macrophages inflammatoires isolés de souris. Les macrophages de 7 à 10 souris ont été regroupés par condition. c, ICP-MS de cuivre cellulaire dans des SPM ou des AM de souris témoins (simulation) et de souris subissant une inflammation aiguë. LPS : simulacre (n = 5 souris), traité au LPS (n = 4 souris) ; CLP : simulacre (n = 10 souris), avec CLP (n = 8 souris) ; SARS-CoV-2 : simulacre (n = 10 souris), infecté par le SARS-CoV-2 (n = 10 souris). d, transferts Western des marques d'histone dans les SPM de souris traitées avec LPS et LCC-12. Macrophages de 4 à 7 souris regroupées par condition. H3 est un témoin de traitement d'échantillon. e, Diagramme de classement pour l'ARN seq des SPM de souris traitées avec LPS et LCC-12. f, Western blots de protéines impliquées dans l'inflammation dans les SPM de souris traitées avec LPS et LCC-12. Les macrophages de 4 à 7 souris ont été regroupés par condition. g, cytométrie en flux de SPM de souris traitées avec LPS et LCC 12 (n = 7–9 souris). h, courbes de survie de Kaplan–Meier des souris traitées au LPS (20 mg kg par ⁻¹ une seule dose; injection intrapéritonéale; n = 10 souris) et LCC-12 (0,3 mg kg 2 h avant ⁻¹ épreuve, puis 24h, 48h, 72h et 96h après épreuve ; injection intrapéritonéale; n = 10 souris) ou dexaméthasone (10 mg kg par dose ⁻¹ 1 h avant l'épreuve ; gavage oral ; n = 10 souris). i, Courbes de survie de Kaplan–Meier des souris soumises au CLP et traitées au LCC-12 (0,3 mg kg 4 h, 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après CLP ; injection intrapéritonéale ; n = 10 souris), dexaméthasone (1,0 mg kg au moment de la CLP ; injection intrapéritonéale ; n = 10 souris) ou une solution saline (injection intrapéritonéale ; n = 10 souris). En d–g, LCC-12 (0,3 mg kg) a été injecté 6 h

après le LPS et les échantillons ont été prélevés 22 h après le LPS. c, g, Test de Mann-Whitney bilatéral. h,i, test du log-rank de Mantel–Cox. Rapport de risque calculé à l'aide de la méthode Mantel-Haenszel. ND, non déterminé.

[Données source](#)

Discussion

Le CD44 a déjà été lié au développement, aux réponses immunitaires et à la progression du cancer. Ici, nous avons montré que CD44 médie l'absorption cellulaire de métaux spécifiques, y compris le cuivre, régulant ainsi l'activation des cellules immunitaires. Nous avons identifié un pool chimiquement réactif de cuivre(II) dans les mitochondries qui caractérise l'état inflammatoire des macrophages. Nos données supportent un mécanisme cellulaire par lequel l'activation du peroxyde d'hydrogène par le cuivre(II) permet l'oxydation du NADH en reconstituer le pool de NAD^+ . Le maintien de ce cycle redox est nécessaire pour la production de NAD de métabolites clés essentiels à la programmation épigénétique. Dans ce contexte, le cuivre(II) agit directement comme un catalyseur métallique, contrairement à son effet métalloallostérique dynamique dans d'autres procédés. Les changements transcriptomiques dans les macrophages exposés à des classes distinctes d'agents pathogènes confirment la nature générale de cette mécanisme.

Nous avons conçu un dimère de biguanides capable d'inactiver le cuivre(II) mitochondrial, déclenchant ainsi une reprogrammation métabolique et épigénétique qui réduit la état cellulaire inflammatoire et augmente la survie dans les modèles précliniques de inflammation. Nous avons ainsi illustré la pertinence physiopathologique de cette chaîne d'événements moléculaires déclenchés par le cuivre(II). L'inflammation aiguë rappelle donc une maladie métabolique qui peut être rééquilibrée en ciblant le cuivre(II) mitochondrial pour limiter la génération de métabolites clés nécessaires à l'initiation et au maintien de l'état inflammatoire (Extended Data Fig. 10g). LCC-12 cible sélectivement le cuivre (II) mitochondrial, qui est plus abondant dans l'état cellulaire inflammatoire de la maladie que dans l'état basal. Ce médicament a également interféré avec le processus d'EMT dans les cellules cancéreuses, soutenant un rôle plus large pour cette voie de signalisation du cuivre dans la régulation des changements transcriptionnels au-delà de l'inflammation. Ainsi, CD44 peut être caractérisé comme un régulateur de la plasticité cellulaire. La metformine a des effets positifs sur

santé humaine et est à l'étude comme médicament anti-âge. Cependant, l'enquête
Son mécanisme d'action est entravé par sa mauvaise pharmacologie entraînant une faible puissance, ce qui nécessite l'administration de fortes doses. Ainsi, LCC-12, que nous renommons « supformine », présente des caractéristiques biologiques et précliniques améliorées par rapport à la metformine, ce qui en fait une petite molécule de type médicament appropriée pour révéler de nouvelles caractéristiques mécanistes des biguanides. Dans l'ensemble, nos résultats mettent en évidence le rôle central du cuivre (II) mitochondrial en tant que régulateur de la plasticité cellulaire et dévoilent une stratégie thérapeutique basée sur le contrôle et l'ajustement des états cellulaires épigénétiques.

Méthodes

Déclaration d'éthique

Des échantillons de sang périphérique ont été prélevés sur 128 donneurs sains à l'Etablissement Français du Sang (EFS). L'utilisation d'échantillons sanguins de l'EFS provenant de donneurs anonymes a été approuvée par le comité de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Le consentement écrit a été obtenu de tous les donneurs. L'évaluation de la survie à l'aide du modèle de souris LPS a été réalisée chez Fidelta conformément aux normes 2010/63/UE et nationales législatives régissant l'utilisation des animaux de laboratoire dans la recherche scientifique et pour autres fins (Journal officiel 55/13). Un comité institutionnel d'éthique de la recherche animale (CARE-Zg) a veillé à ce que les procédures liées aux animaux ne soient pas compromettre le bien-être animal. Cytométrie en flux, ICP-MS, western blot et L'ARN-seq utilisant les modèles de souris LPS a été réalisé conformément aux lois françaises sur l'expérimentation animale (#2021072216346511) et approuvé par Institutional Animal Care and Use Committee of Université de Saint-Quentin-en Yvelines (C2EA-47). Tous les travaux sur les animaux utilisant le modèle CLP ont été menés conformément aux lois françaises sur l'expérimentation animale (#2021072216346511) et approuvés par le Comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux de l'Université de Saint-Quentin-en-Yvelines (C2EA-47). Tous les travaux animaux concernant le RNA-seq sur le modèle SARS-CoV-2 ont été réalisés au sein de l'installation de niveau 3 de biosécurité de l'Institut Pasteur de Lille, après validation des protocoles par les autorités locales. comité d'évaluation des risques biologiques et a respecté les réglementations nationales et institutionnelles et référentiel éthique (Institut Pasteur de Lille/ B59-350009). Les protocoles expérimentaux utilisant des animaux ont été approuvés par le

institutional ethical committee Comité d'Éthique en Experimentation Animale (CEEA) 75, Nord-Pas-de-Calais. L'étude animale a été autorisée par le ministère de l'Éducation, de la Recherche et de l'Innovation sous le numéro d'enregistrement APAFIS#25517-2020052608325772v3. Des travaux animaux concernant la cytométrie, l'ICP-MS et le western blot sur le modèle SARS-CoV-2 ont été réalisés au sein de l'installation de niveau 3 de biosécurité de l'Université de Toulouse. Ce travail a été supervisé par un Comité Institutionnel d'Éthique de la Recherche Animale (licence APAFIS#27729-2020101616517580 v3, Ministre de Recherche, France (CEEA-001)), pour s'assurer que les procédures liées aux animaux ne compromettaient pas le bien-être des animaux.

Anticorps

Les anticorps sont annotés ci-dessous comme suit. WB, western blot; FCy, cytométrie en flux ; FM, microscopie à fluorescence ; N.-É., NanoSIMS ; CHIP, ChIP-seq ; Hu, utilisé pour l'homme échantillons ; Ms, utilisé pour les échantillons de souris. Les dilutions sont indiquées. Toute validation d'anticorps par les fabricants est indiquée et peut être trouvée sur les sites Web des fabricants. Notre validation d'anticorps par knockdown (KD) et/ou stratégies KO telles que décrites ici pour les anticorps pertinents est indiquée. Anticorps primaires : ALKBH1 (Abcam, ab195376, clone EPR19215, lot GR262105-2, WB 1:1000, Hu, Ms, KO validé par le fabricant), la sous-unité alpha de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK α , Cell Signaling, 2532S, lot 21, WB 1:1 000, Hu), p-AMPK α phosphorylé sur Thr172 (p AMPK α , Cell Signaling, 2535S, lot 27, WB 1:1 000, Hu), ATF2 (Abcam, ab32160, clone E243, lot GR3430555-1, WB 1:1 000, Hu), ATF2 (Proteintech, 14834-1-AP, WB 1:1 000, Mme, KD/KO validé par le fabricant, ATP7A (Santa Cruz Biotechnology, SC-376467, clone D-9, lotJ2821, WB 1:200, Hu), ATP7A (Novus Biologicals, NBP2-59376, clone S60-4, WB 1:1 000, Ms), ATP7B (Santa Cruz Biotechnology, sc-373964, clone A-11, lot I2719, WB 1:200, Hu, Ms), catalase (Cell Signaling, 12980T, clone D4P7B, lot 3, WB 1:1 000, Hu), CCL2 (également appelé Mcp1)(Proteintech, 66272-1-Ig, clone 1B9F7, WB 1:1 000, Hu), CD11b-Pacific Blue (BioLegend, 101224, clone M1/70, lot B350151, B323654 et B323653, FCy 1:800, Ms), CD14-Krome Orange (Beckman Coulter, B01175, clone RMO/52, lot 200040, FCy 1:100, Hu), CD16-Pacific Blue (Beckman

Coulter, B36292, clone 3G8, lot 200029, FCy 1:100, Hu), CD3 (BioLegend, 317326, clone OKT3, lot B372352, activation des lymphocytes $^{-1}$, Hu), CD25-BV711 (BioLegend, T, 2,5 μ g/ml 302636, clone BC96, lot B281779, FCy 1:100, Hu), CD28 (BioLegend, 302934, clone CD28.2, lot 374639, activation des $^{-1}$, Hu), CD40-APC (BioLegend, 124612, lymphocytes T, 2,5 μ g/ml clone 3/23, lot B309981, FCy 1:200, Ms), CD40-BV510 (BioLegend, 334329, clone 5C3, lot 312131, FCy 1:100, Hu), CD44 (Abcam, ab189524, lot GR320797-13, GR3314218 -16, clone EPR18668, WB 1:30 000, Hu, Ms, KO/KD validé par nous et le fabricant), CD44 (Thermo Fisher Scientific, 701406, clone 19H8L4, lot 1976318, FM 1:400, Hu), CD44-AF647 (Novus Biologicals, NB500-481AF647, clone MEM-263, lot 118753, FCy 1:100, Hu), CD44-AF647 (BioLegend, 103018, clone IM7, lot B317762, FCy 1:200, Ms), CD45-BV510 (BioLegend, 103138, clone 30-F11, lot B362964, B322199, B333193, FCy 1:200, Ms), CD64-FITC (BioLegend, 399505, clone S18012C, lot 308498, Hu), CD66b-PE/Cy7 (BioLegend, 305115, clone G10F5, lot 283925, FCy 1:100, Hu), CD69-PerCP (BioLegend, 310928, clone FN50, lot B290414, FCy 1:100, Hu), CD80-AF700 (BD Biosciences, 561133, clone 307.4, lot 1060235, FCy 1:100, Hu), CD83-PE (BioLegend, 305307, clone HB15e, lot B303073, FCy 1:100, Hu), CD86-PE (BioLegend, 105007, clone GL-1, lot B318893, FCy 1:200, Ms), CD86-PE/Cy7 (BD Biosciences, 561128, clone 2331 (FUN-1), lot 1309531, FCy 1:33, Hu), CD109 (Santa Cruz Biotechnology, sc-271085, clone C-9, lot E1018, WB 1:200, Hu), CD109 (Biotechne, AF7717-SP, WB 1:1 000, Ms), CD163-PE (BD Biosciences, 556018, clone GHI/61, lot 9143793, FCy 1:100, Hu), CD170 (Siglec-F)-PEeFluor 610 (eBioscience, 61-1702-80, clone 1RNM44N, lot 2472220 et 2152352, FCy 1:200, Ms), cGAS (Cell Signaling, 15102, clone D1D3G, lot 4, WB 1:1 000, Hu), cGAS (Cell Signaling, 31659, clone D3O8O, lot 3, WB 1:1 000, Ms), CLOCK (Proteintech, 18094-1-AP, WB 1 : 1000, Hu, KD/KO validé par le fabricant), CLOCK (Abcam, ab3517, WB 1:1 000, Ms), CTR1 (Abcam, ab129067, clone EPR7936, lot GR3414582-4 et GR81444-2, WB 1:1 000, Hu, KD validé par nos soins), CTR2 (Novus Biologicals, NBP1-05199SS, WB 1:1 000, Hu), CTR2 (Novus Biologicals, NBP1-85512, lot R05901, FM 1:400, Hu), CTR2 (Biorybt, orb182668, lot BR2373, WB 1:1 000, Hu) COX IV (Abcam, ab16056, lot GR320655-1, FM 1:400, Hu), CREM (Proteintech, 12131-1-AP, WB 1:1 000, Hu), cytochrome c (Cell Signaling, 12963S, clone 6H2.B4, lot 1 et 2, FM 1:400, NS 1:400, Hu), DMT1 (Abcam, ab55735, clone 4C6, lot GR3243346-1, WB 1:1000, Hu, KD validé par nous), anticorps anti- drosophile (Active Motif, 61686, lot 23521010, puce 50 ng par condition), E-

cadhérine (Cell Signaling, 3195, clone 24E10, lot 15, WB 1:1,000, Hu), E-cadhérine (BD Biosciences, 610181, clone 36, lot 7187865, WB 1:1 000, Ms), F4/80-BV605 (BioLegend, 123133, clone BM8, lot B362524, B309659, B331465 et B339746, FCy 1:100, Ms), F4/80-PE (TONBO, TNB50-4801-U100, clone BM8.1, lot C4801060619503, FCy 1:100, Ms), fibronectine (Sigma-Aldrich, F0791, clone IST-3, lot 026M4781V, WB 1:1 000, Hu, Ms), FTO (Proteintech, 27226-1-AP, WB 1:1 000, Hu, Ms, KD/KO validé par fabricant), H3 (Cell Signaling, 9715S, lot 23, FM, WB 1:1,000, Hu, Ms), H3K4me3 (Diagenode, C15410003-50, lot A8034D, FM 1:400, Hu, validation dot blot par le fabricant), H3K9ac (Cell Signaling, 9649S, clone C5B11, lot 13, FM, WB, CHIP 6 µl pour 10 cellules, Hu, Ms, validé avec SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP par le fabricant), H3K9me2 (Cell Signaling, 4658S, clone D84B4, lot 10, FM 1:400, WB 1:1 000, CHIP 6 µl pour 10 cellules, Hu, Ms, validé avec SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP par fabricant), H3K9me3 (Cell Signaling, 13969S, clone D4W1U, lot 3, FM 1:400, Hu, validé avec SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP par le fabricant), H3K14ac (Cell Signaling, 7627S, clone D4B90, lot 6, FM, WB 1:1,000, CHIP 6 µl pour 10 cellules, Hu, Ms, validé avec SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP par le fabricant), H3K27ac (Cell Signaling, 8173S, clone D5E4, lot 8, FM, WB 1:1,000, Puce 6 µl pour 10 cellules, Hu, Ms, validé avec SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP par le fabricant), H3K27me3 (Cell Signaling, 9733S, clone C36B11, lot 19, FM 1:400, WB 1:1 000, CHIP 6 µl pour 10 cellules, Hu, Ms, validé avec SimpleChIP Enzymatic Chromatine IP par fabricant), H3K36me2 (Abcam, ab9049, lot GR3258133-1, FM 1:400, Hu), hyaluronane synthase 1 (HAS1, Novus Biologicals, NBP1-51635, clone 3E10, lot 141031, WB 1:1 000, Hu), HAS1 (Sigma-Aldrich, SAB4300848, lot 492637613, WB 1:1 000, Ms), hyaluronane synthase 2 (HAS2, Abcam, ab140671, clone 4E7, lot GR3212928-2, WB 1:1 000, Hu), HAS2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-514737, clone A-7, WB 1:200, Ms), hyaluronane synthase 3 (HAS3, Abcam, ab154104, lot GR113715-12, WB 1:1 000, Hu), HAS3 (Proteintech, 15609-1-AP, WB 1:1 000, Ms, KO/KD validé par nous et le fabricant), HAT1 (Proteintech, 11432-1-AP, WB 1:1 000, Hu, Ms, KO/KD validé par nous et le fabricant), 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC, Active Motif, 39069, lot 23720003, FM 1:400, Hu, dot blot validé par le fabricant), IA/IE AF700 (BioLegend, 107622, clone M5/114.15.2, lot B313251, FCy 1:400, Ms), IRAK4 (Cell Signaling, 4363T, lot 5, WB 1:1,000, Hu, Ms), JAK2 (Cell Signaling, 3230T, clone D2E12, WB 1:1,000, lot 13, Hu, Ms), JMJD6 (Abcam, ab64575, lot GR3441511-1, WB

1:1 000, Hu, Ms), KAT2B/PCAF (Cell Signaling, 3378T, clone C14G9, lot 2, WB 1:1 000, Hu, Ms, validé avec SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP par le fabricant), KAT3A (également connu sous le nom de CREBBP)(Abcam, ab2832, lot GR3360262-6, WB 1:1,000, Hu, Ms), KAT5 (également connu sous le nom de Tip60)(Santa Cruz Biotechnology, sc-166323, clone C-7, lot 166323, WB 1:200, Hu, Ms), KAT6A (également connu sous le nom de MOZ)(Santa Cruz Biotechnology, sc-293283, clone 4D8, lot F0420, WB 1:200, Hu), KAT6A (Invitrogen, PA5-103467, parcelle XH3653004, WB 1:1 000, Ms), KAT8 (également connu sous le nom de MOF) (Proteintech, 13842-1-AP, KD/KO validé par le fabricant, WB 1:1 000, Hu, Ms), KDM2A (Abcam, ab191387, clone EPR18602, lot GR3330146-4, WB 1:1 000, Hu, Ms, KO validé par le fabricant), KDM5A (aussi connu sous le nom de Jarid1a)(Cell Signaling, 3876S, clone D28B10, lot 5, WB 1:1,000, Hu, Ms), KDM5B (également connu sous le nom de Jarid1b)(Cell Signaling, 3273T, lot 3, WB 1:1 000, Hu), KDM5B (Abcam, ab181089, clone EPR12794, WB 1:1 000, Mme, KO validé par le fabricant), KDM5C (également appelé Jarid1c)(Cell Signaling, 5361, clone D29B9, lot 1, 5361, WB 1:1 000, Hu, Ms), KDM6A (également appelé UTX)(Cell Signalisation, 33510S, clone D3Q1I, lot 4, WB 1:1 000, Hu, Ms), KDM6B (Abcam, ab169197, WB 1:1 000, Hu), KDM6B/JMJD3 (Cell Signaling, 3457, WB 1:1 000, Ms) , KDM7A (Invitrogen, PA5-96987, lot UI2838718, WB 1:1 000, Hu, Ms), Ly6C–PerCP/Cy5.5 (BioLegend, 128012, clone HK1.4, lot B363119 et B310463, FCy 1:200, Ms), Ly6G–PE Cy7 (BioLegend, 127618, clone 1A8, lot B288785 et B351626, FCy 1:200, Ms), Ly6G–AF647 (BioLegend, 127610, clone 1A8, lot B2559839, FCy 1:200, Ms), lysosome protéine membranaire associée 2 (LAMP2)(Abcam, ab25631, clone H4B4, FM 1:400, Hu), NOS2–APC (eBioscience, 17-5920-82, clone CXNFT, lot 2154045, FCy 1:100, Ms), SLC25A3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-376742, clone F-1, lot H2313, WB 1:200, FM 1:100, Hu, KO validé par nos soins), SLC25A3 (Abcam, ab89117, lot 1015892-1, FM 1:400, Hu), SLC25A37 (MyBiosource, MBS9210193, clone ID : RB24153, lot SA100524AR, WB 1:1000, FM 1:400, Hu, KD validé par nos soins), Slug (Cell Signaling, 9585S, clone C19G7, lot 6, WB 1:1000, Hu, Ms), STAT1 (Cell Signaling, 14994T, clone D1K9Y, lot 8, WB 1:1 000, Hu, Ms, validé avec SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP par le fabricant), STAT2 (Abcam, ab32367, clone Y141, lot GR3294792-5, WB 1:1 000, Hu, Ms, KO validé par le constructeur), SOD2 (Abcam, ab13534, lot GR3345921-12 et GR33618-52, FM 1:400, WB 1:1000, Hu, Ms, KD validé par nos soins), Tet methylcytosine dioxygénase 2 (TET2, Abcam, ab94580, lot GR3243631-2, WB 1:1000, Hu, Ms), Tet méthylcytosine dioxygénase 3 (TET3, Abcam, ab139311, lot GR3314447-1, WB 1:1 000,

Hu, Ms), TRAF2 (signalisation cellulaire, 4724T, clone C192, lot 2, WB 1:1 000, Hu, Ms), TFR1 (Invitrogen, 13-6800, clone H68.4, lot VJ313549, WB 1:1 000, Hu, KD validé par nos soins), TFR1–APC–AF750 (Beckman Coulter, A89313, clone YDJ1.2.2, lot 200060, FCy 1 : 100, Hu), γ -tubuline (Sigma-Aldrich, T5326, clone GTU-88, Source 0000128065, WB 1:1 000, Hu, Ms, validation améliorée par le fabricant), Twist (Santa Cruz Biotechnology, sc-81417, clone Twist2C1a , lotJ2213, WB 1:200, Ms), vimentine (Cell Signaling, 5741S, clone D21H3, lot 8, WB 1:1,000, Hu, Ms, KO validé par les utilisateurs précédents selon le site du fabricant). Anticorps secondaires : Alexa Fluor 488 anti-lapin (Invitrogen, A-11070, lot 2161039, FM 1:1 000, Hu), Alexa Fluor 594 anti souris (Invitrogen, A-11032, lot 1826426, FM 1:1 000, Hu), Alexa Fluor 594 anti-lapin (Invitrogen, A11072, lot 1985650, FM 1:1 000, Hu), Alexa Fluor 647 anti-souris (Invitrogen, A21237, lot 1743738, FM 1:1 000, Hu), Alexa Fluor 647 anti-lapin

(Invitrogen, A21246, lot 2418503, FM 1:1 000, Hu), âne anti-lapin IgG-h+I HRP conjugué (Bethyl Laboratories, A120-108P, lot 12 et 13), chèvre anti-mouse IgG h+I HRP conjugué (Bethyl Laboratories, A90-116P, lot 41 et 44), 10 nM d'or chargé de nanoparticules d'or anti-souris (Abcam, ab27241, lot GR274015-2, NS 1:200, Hu).

Cellules primaires

Des échantillons de sang périphérique ont été prélevés sur 128 donneurs sains à l'EFS. L'utilisation d'échantillons de sang EFS provenant de donneurs anonymes a été approuvée par le comité de INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). Written consent a été obtenu auprès de tous les donateurs. Les monocytes pan ont été isolés par magnétoscopie négative tri à l'aide de microbilles selon les instructions du fabricant (Miltenyi Biotec, 130-096-537) et cultivées immédiatement en présence de cytokines pour déclencher la différenciation in vitro comme décrit dans « Culture cellulaire ». Les cellules ont été utilisées fraîches sans congélation préalable. En règle générale, les cellules ont été collectées par incubation avec du PBS 1 × avec EDTA 10 mM à 37 ° C, puis grattées, sauf indication contraire. Des cellules primaires non à petites cellules cancéreuses pulmonaires circulantes ont été obtenues auprès de Celprogen (36107-34CTC) et cultivées comme décrit dans « Culture cellulaire ». Les macrophages primaires de modèles de souris in vivo (LPS, CLP et SARS-CoV-2) ont été isolés et traités comme décrit dans 'LPS-

modèle de septicémie induite », « modèle de septicémie induite par le CLP » et « modèle de septicémie induite par le SRAS-CoV-2 modèle d'inflammation ».

Culture de cellules

Cette étude a été réalisée à l'aide de monocytes primaires obtenus à partir d'échantillons de sang périphérique de 128 donneurs humains distincts de l'EFS. Les monocytes pan ont été isolés par tri magnétique négatif à l'aide de microbilles selon les instructions du fabricant (Miltenyi Biotec, 130-096-537), et cultivés dans du RPMI 1640 additionné de GlutaMAX (Gibco, 61870010), 10 % de sérum bovin fœtal (FBS, Eurobio Scientific, CVFSVF00-01). Pour générer des MDM, des monocytes pan ont été traités avec le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF, Miltenyi Biotec, 130-093-866, 100 ng/ml) pendant 5 jours. Par la suite, LPS (InvivoGen, tlr-3pelps, 100 ng/ml) et de l'interféron- γ (IFN γ , Miltenyi Biotec, 130-096-484, 20 ng/ml) ont été ajoutés¹ au milieu pendant 24 h pour générer des aMDM. Les lymphocytes T CD4 ont été isolés à partir d'échantillons de sang périphérique par tri magnétique négatif à l'aide de microbilles selon les instructions du fabricant (Miltenyi Biotec, 130-096-533) et cultivés dans du RPMI 1640 additionné de glutamine et de 10 % de sérum bovin fœtal. Par la suite, des anticorps CD3/CD28 ont été ajoutés au milieu pendant 48 h pour générer des lymphocytes T CD4 activés. Les lymphocytes T CD8 ont été⁺ isolés à partir d'échantillons de sang périphérique par tri magnétique négatif à l'aide de microbilles selon les instructions du fabricant (Miltenyi Biotec, 130-096-495) et cultivés dans du RPMI 1640 additionné de glutamine et 10 % de sérum bovin fœtal. Par la suite, les anticorps CD3/CD28 ont été ajoutés au milieu pendant 48 h pour générer des lymphocytes T CD4[‡] activés. Pour générer des anti-macrophages inflammatoires, pan monocytes ont été traités avec le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF, Miltenyi Biotec, 130-096-492, 100 ng/ml) pendant 5 jours et ensuite, IL-4 (Miltenyi Biotec, 130-093-921, 20 ng/ml) a été ajouté au milieu pendant 24 h. Les neutrophiles ont été isolés à partir d'échantillons de sang périphérique. Les globules rouges des échantillons de sang total ont été lysés (tampon de lyse eBioscience RBC, 00-4300-54). Les cellules restantes ont été cultivées dans du RPMI 1640 additionné de glutamine et de 2 % de sérum humain. Par la suite, du LPS (2 μ g/ml) a été ajouté¹ pendant 1 h pour générer

neutrophiles. La population de neutrophiles a été déterminée par cytométrie en flux en utilisant Coloration de surface FSC, SSC et CD15. Pour générer des cellules dendritiques, des monocytes pan ont été traités avec du GM-CSF (100 ng/ml) et de l'IL-4 (10⁻¹ ng/ml) pendant 5 jours. Ensuite, du LPS (100 ng/ml) a été ajouté au milieu pour générer des cellules dendritiques activées (aDC).

Les cellules cancéreuses pancréatiques de souris FC1242 étaient un don généreux du laboratoire Tuveson (Cold Spring Harbor Laboratory) et ont été cultivées dans le milieu Eagle modifié GlutaMAX de Dulbecco (DMEM, Gibco, 61965059) additionné de 10 % de FBS (Gibco, 10270-106) et de pénicilline-streptomycine mélange (BioWhittaker/Lonza, DE17-602E). Les cellules ont été traitées avec TGF- β (Miltenyi Biotec, 130-095-066, 10 ng/ml) pendant 6 jours. Des cellules primaires non à petites cellules cancéreuses pulmonaires circulantes (Celprogen, 36107-34CTC, lot 219411, sexe : femelle) ont été cultivées en utilisant un milieu complet de cellules souches (Celprogen, M36102-29PS) jusqu'au troisième passage. Ces cellules étaient cultivées dans des flacons ECM T75 de cellules souches (Celprogen, E36102-29-T75) et des plaques ECM à 6 puits (Celprogen, E36102-29-6Well) et traité avec TGF- β pendant 3 jours.

Les MDM ont été activés avec LPS et IFN γ et co-traités avec ATTm (Sigma-Aldrich, 323446, 10 μ M) ou EDTA (Euromedex, EU0007, 500 μ M), hyaluronate (Carbosynth, FH45321, 600-1000 kDa, 1 mg/ml), hyaluronate méthylé (maison, 1 mg/ml), LCC-12 (maison, 10 μ M), LCC-4,4 (maison, 10 μ M), metformine (chlorhydrate de 1,1-diméthylbiguanide, Alfa Aesar, J63361, 10 mM), D- pénicillamine (Sigma-Aldrich, P4875, 250 μ M), chlorhydrate de trientine (Trien, Sigma-Aldrich, PHR1495-500MG, 200 μ M) ou anticorps thérapeutique anti-CD44 humain (RG7356, Creative Biolabs, TAB-128CL, 10 μ g/ml) pendant 24 h. Les aMDM ont été traités avec CCCP (Sigma-Aldrich, C2759, 10 μ M), N, C-LCC-12^{15,13} (interne, 10 μ M), LCC-12,4 (interne, 100 nM) ou trientine alcane (interne, 10 μ M) pendant 3h, en ajoutant les réactifs directement dans le milieu. Les cellules dendritiques ont été co-traitées avec LPS et LCC-12 (10 μ M) pendant 24 h.

Les lymphocytes T⁺ CD4 et CD8 ont été co-traités avec CD3/CD28 et LCC-12 (50 μ M) pendant 48 h. Les macrophages anti-inflammatoires ont été co-traités avec IL-4 et LCC-12 (10 μ M) pendant 24 h. Les neutrophiles ont été co-traités avec LPS et LCC-12 (10 μ M) pendant 1 h. Des cellules cancéreuses pulmonaires primaires non à petites cellules circulantes et des cellules FC1242 ont été co-traitées avec TGF- β et LCC-12 (1 μ M) pendant 3 jours et 6 jours, respectivement.

Cytométrie en flux

Pour les cellules immunitaires humaines : les cellules ont été lavées avec du PBS 1 x glacé, incubées avec du Fc bloc (Human TruStain FcX, BioLegend, 422302, 1:20) pendant 15 min, puis incubé avec des anticorps pendant 20 min à 4 °C dans du PBS 1 x/albumine de sérum bovin à 0,5 % (BSA) puis lavé avant analyse à l'aide d'un cytomètre en flux (BD LSR Fortessa X 20). Les cellules ont été analysées avec les panels d'anticorps correspondants. Les cellules cancéreuses primaires circulantes du poumon non à petites cellules et les cellules FC1245 ont été collectées par trypsinisation à l'aide de trypsine / EDTA (GIBCO, TRYPGIB01), lavées avec du PBS 1 × et des anticorps l'incubation a été effectuée pendant 20 min à 4 °C dans du PBS 1 × / FBS à 10%. Les cellules ont été lavées et analysées à l'aide d'un cytomètre en flux (BD Accuric C6). Pour la cytométrie en flux sur les cellules du modèle murin LPS, voir le paragraphe du modèle de septicémie induite par le LPS. Couler analyse par cytométrie du contenu mitochondrial en H_2O_2 : les MDM ont été activés avec du LPS et IFN γ , en présence de MitoPY1 (R&D Systems, 4428/10, 5 μ M) pendant 24h. La fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. Analyse en cytométrie en flux avec la sonde Cu(II) mitochondriale M-2 : les naMDM, aMDM et MDM³⁹ activés avec LPS et IFN γ et co-traités avec LCC-12 (10 μ M) ont été incubés avec M-2 (5 μ M) pendant 1h. La fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo v. 10.8.2.

ICP-MS

Les flacons en verre équipés de septa en téflon ont été nettoyés avec de l'acide nitrique 65% (VWR, Suprapur, 1.00441.0250), lavé à l'eau ultra pure (Sigma-Aldrich, 1012620500) et séché. Les cellules ont été collectées et lavées deux fois avec du PBS 1X. Les cellules étaient alors compté à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (Entek) et transféré dans 200 μ l de PBS 1 × ou d'eau ultrapure dans les flacons en verre nettoyés. Le même volume de PBS 1 × ou d'eau ultrapure a été transféré dans des flacons séparés pour la soustraction de fond, au moins en double par expérience. Les mitochondries, les noyaux et les réticules endoplasmiques ont été

extrait comme décrit dans « Isolation des mitochondries » à partir d'une population pré-comptée de cellules. Les échantillons ont été lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur (CHRIST, 2–4 LDplus). Les échantillons ont ensuite été mélangés avec de l'acide nitrique à 65 % et chauffés à 80 °C pendant la nuit dans les mêmes flacons en verre fermés par un couvercle portant un septum en téflon. Les échantillons ont ensuite été refroidis à température ambiante et dilués avec de l'eau ultrapure jusqu'à une concentration finale d'acide nitrique de 0,475 N et transférés dans des flacons à centrifuger sans métal (VWR, 89049-172) pour des analyses de spectrométrie de masse ultérieures. Les quantités de métaux ont été mesurées à l'aide d'un ICP-QMS Agilent 7900 en mode basse résolution, en tenant compte de la distribution naturelle des isotopes. L'introduction de l'échantillon a été réalisée avec un micro-nébuliseur (MicroMist, 0,2 ml min⁻¹) à travers une chambre de nébulisation Scott. Les isotopes ont été mesurés à l'aide d'une interface de réaction de collision avec de l'hélium gazeux (5 ml min⁻¹) pour éliminer les interférences polyatomiques. Les étalons internes de scandium et d'indium ont été injectés en mélange avec les échantillons pour contrôler l'absence de dérive du signal et d'effets de matrice. UN mélange d'étalons certifiés a été mesuré à des concentrations couvrant celles des échantillons pour convertir les mesures de comptage en concentrations dans la solution. Les valeurs ont été normalisées par rapport au nombre de cellules.

Western blot

Les MDM ont été traités comme indiqué puis lavés avec du PBS 1X. Pour les MDM, les protéines ont été solubilisées dans un tampon Laemmli 2x contenant de la benzonase (VWR, 70664-3, 1:100).

Les extraits ont été incubés à 37 ° C pendant 1 h et chauffés à 94 ° C pendant 10 min, et quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). SPM et

Les AM des modèles de souris LPS, CLP et SARS-CoV-2 ont été isolés par flux

cytométrie comme décrit dans la section correspondante sur la cytométrie en flux. En raison du faible nombre de cellules, les SPM ont été collectés dans du PBS 1 ×, qui a ensuite été lyophilisé dans des tubes Eppendorf. Le matériau séché a été solubilisé dans un tampon Laemmli 2x contenant de la benzonase. Les AM ont été culottés et les culots cellulaires ont été solubilisés dans un tampon Laemmli 2x contenant de la benzonase. Des extraits de SPM et AM ont ensuite été incubés à 37 °C pendant 1 h et chauffés à 94 °C pendant 10 min. Des extraits de protéines de SPM et AM ont été quantifiés à l'aide d'un Qubit (Invitrogen) et d'un test de quantification des protéines Qubit

(Invitrogen, Q33212). Pour le modèle LPS, les SPM ont été regroupés pour 8 souris fictives, pour 4 souris traitées au LPS et pour 6 souris traitées au LPS et au LCC-12. Pour le modèle CLP, les SPM ont été regroupés à partir de 8 souris fictives et de 7 souris soumises au CLP. Pour le SRAS-CoV-2 modèle, les AM ont été regroupés pour 10 souris fictives et pour 10 souris infectées par le SRAS-CoV-2. Les lysats de protéines ont été résolus par SDS – PAGE (système de verrouillage sûr Invitrogen et gels préfabriqués NuPAGE 4–12% Bis-Tris). Dans une expérience typique à partir de MDM ou de cellules cancéreuses, 10 à 20 µg d'extrait protéique total ont été chargés par voie dans un tampon Laemmli 2× contenant du bleu de bromophénol. Pour les SPM et AM isolés in vivo où les quantités de protéines étaient limitées, généralement 1 µg d'extrait protéique total a été chargé (plus de lysat protéique a été chargé). chargé dans une nouvelle expérience si l'anticorps ne pouvait pas reconnaître une bande spécifique à ces quantités de protéines). Sur chaque gel, un marqueur de taille a été appliqué (3 µl PageRuler ou PageRuler plus, Thermo Scientific, 26616 ou 26620 et 17 µl de tampon 2× Laemmli) dans parallèle. Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Amersham Protran 0,45 µm) en utilisant une cellule de transfert électrophorétique semi-sèche Trans-Blot SD (Bio rad) en utilisant un tampon de transfert 1 × NuPage (Invitrogen, NP00061) avec 10 % de méthanol. Les membranes ont été bloquées avec 5% de poudre de lait écrémé écrémé (Régilait) dans 0,1% Tween-20/1X PBS pendant 20 min. Les membranes ont été coupées à la taille de marqueur appropriée pour permettre le sondage de plusieurs anticorps sur la même membrane. Les transferts ont ensuite été sondés avec les anticorps primaires pertinents dans 5 % de BSA, 0,1 % de Tween-20/1 × PBS ou dans 5 % de lait écrémé en poudre dans 0,1 % de Tween-20/1 × PBS à 4 °C pendant une nuit avec une solution douce. mouvement dans un sac en plastique transparent scellé à la main. Les membranes ont été lavées avec 0,1 % de Tween-20/1× PBS trois fois et incubé avec de la peroxydase de raifort anticorps secondaires conjugués (Jackson Laboratories) dans 5 % de poudre de lait écrémé écrémé, 0,1 % de Tween-20/1 × PBS pendant 1 h à température ambiante et lavé trois fois avec 0,1 % de Tween-20/1× PBS. Les antigènes ont été détectés à l'aide des kits de détection chimiluminescents SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific, 34580) et SuperSignal West Femto (Thermo Scientific, 34096). Pour les protéines de transfert sur les mêmes membranes, un tampon de décapage (0,1 M TRIS pH 6,8, 2 % SDS p/v, 0,1 M β mercaptoéthanol) a été utilisé pendant 30 min et les membranes ont été lavées avec 0,1 % Tween-20/1 × PBS et retransférées ensuite comme décrit ci-dessus. Les signaux ont été enregistrés à l'aide d'un système d'imagerie Fusion Solo S (Vilber). Pour les marques d'histone, H3 a été utilisé comme contrôle de traitement d'échantillon sur un gel séparé en parallèle et est affiché dans le panneaux respectifs. La γ-tubuline a servi de contrôle de charge sur les mêmes gels et n'est pas

affichées dans les panneaux respectifs. Les quantifications de bande ont été effectuées avec FIJI 2.0.0-rc-69/1.52n en utilisant l'intensité des pixels normalisée par rapport au signal de la γ -tubuline. Toutes les analyses complètes des transferts sont affichées [dans les informations supplémentaires](#).

Microscopie à fluorescence

Les monocytes isolés ont été étalés sur des lamelles, différenciés et activés comme décrit dans "Culture cellulaire". Pour la détection par fluorescence du hyaluronate et du Lys-Cu, les cellules vivantes ont été traitées avec du hyaluronate-FITC (800 kDa, Carbosynth, YH45321, 0,1 mg ml⁻¹) et Lys-Cu (maison, 20 μ M, 1 h) pendant 1 h en présence ou en l'absence de hyaluronidase (Sigma-Aldrich, H3884, 0,1 mg ml⁻¹). Hyaluronate-FITC et hyaluronidase ont été solubilisés ensemble dans un milieu pendant 2 h à 37 ° C avant d'être ajoutés à les cellules. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS 1X, fixées avec 2% paraformaldéhyde dans du PBS 1X pendant 12 min puis lavé 3 fois avec du PBS 1X. Pour coloration des anticorps, les cellules ont ensuite été perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,1% dans du PBS 1 \times pendant 5 min et lavées 3 fois avec du PBS 1 \times . Ensuite, les cellules ont été bloquées dans 2 % de BSA, 0,2 % de Tween-20/1X PBS (tampon de blocage) pendant 20 min à température ambiante. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps pertinent dans un tampon de blocage pendant 1 h à température ambiante, lavées 3 fois avec du PBS 1X et ont été incubées avec des anticorps secondaires pendant 1 h. Enfin, les lamelles ont été lavées 3 fois avec du PBS 1 \times et montées à l'aide de VECTASHIELD contenant du DAPI (Vector Laboratories, H-1200-10). Les images de fluorescence ont été acquises à l'aide d'un microscope en temps réel Deltavision (Applied Precision). 40 \times /1.4NA, Des objectifs 60 \times /1.4NA et 100 \times /1.4NA ont été utilisés pour les acquisitions et toutes les images ont été acquis sous forme de piles z. Les images ont été déconvoluées avec SoftWorx (Ratio conservateur—15 itérations, Applied Precision) et traitées avec FIJI 2.0.0-rc-69/1.52n. L'intensité de fluorescence est affichée en unités arbitraires (UA) et n'est pas comparable entre les différents panneaux. La quantification de la colocalisation a été calculée à l'aide de FIJI 2.0.0-rc-69/1.52n. La quantification des histones a été réalisée à l'aide de FIJI 2.0.0-rc-69/1.52n en délimitant les noyaux à l'aide de la fluorescence DAPI et en calculant l'intensité de fluorescence moyenne normalisée par zone.

Marquage de petites molécules à l'aide de la chimie du clic

Les aMDM sur des lamelles ont été traités avec LCC-12,4 (maison, 100 nM, 3 h) en l'absence ou présence de compétiteur CCCP ou LCC-12 (10 μ M, 3 h), fixé et perméabilisé comme indiqué au paragraphe microscopie à fluorescence. Mitotracker (Invitrogen, M22426) a été ajouté aux cellules vivantes pendant 45 min avant la fixation. Pour le marquage intracellulaire de la trientine, des cellules vivantes ont été incubées avec de l'alcyne trientine (en interne, 10 μ M, 3 h). Le cocktail click reaction a été préparé à l'aide du kit Click-iT EdU Imaging (Invitrogen, C10337) selon le protocole du fabricant. Dans une expérience typique, nous avons mélangé 50 μ l de tampon de réaction Click-iT 10 \times avec 20 μ l de solution CuSO₄, 1 μ l d'Alexa Fluor-azide, 50 μ l d'additif de tampon de réaction (ascorbate de sodium) et 379 μ l d'eau ultrapure pour atteindre un volume final de 500 μ l. Pour les variations indiquées sur les figures, les réactions ont été réalisées avec ou sans CuSO₄ et ascorbate. Les lamelles ont été incubées avec le cocktail de réaction de clic dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min, puis lavé trois fois avec du PBS 1 \times . L'immunofluorescence a ensuite été réalisée comme décrit dans « Microscopie de fluorescence ».

Imagerie NanoSIMS

Les MDM ont été cultivés sur des lamelles et activés pour obtenir des aMDM comme décrit dans 'Cell culture'. Les cellules ont été traitées avec 10 μ M de N¹⁵, C¹³-LCC-12 pendant 3 h. Par la suite, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1 \times , une fois avec du tampon cacodylate 0,1 M (LFG Distribution, 11653), puis fixées avec du paraformaldéhyde à 2% dans du tampon cacodylate 0,1 M pendant 20 min. Alors, les cellules ont été lavées trois fois avec du tampon cacodylate 0,1 M pendant 5 min et perméabilisé avec 0,1 % de Triton X-100 dans du tampon cacodylate 0,1 M pendant 5 min. Ensuite, les cellules ont été lavées trois fois avec du tampon cacodylate 0,1 M et un tampon de blocage (2% BSA, 0,1% Tween dans un tampon cacodylate 0,1 M) a été ajouté pendant 20 min. L'anticorps primaire (1:400) a été ajouté pendant 1 h dans un tampon de blocage. Ensuite, les cellules ont été lavées trois fois avec du tampon cacodylate 0,1 M et le tampon or-nanoparticule 10 nM

l'anticorps secondaire chargé (1:50) a été ajouté dans un tampon de blocage pendant 1 h. Les cellules étaient lavées trois fois avec du tampon cacodylate 0,1 M et traitées avec 1 % d'OsO₄ (Electron Microscopy Sciences, 19152) dans du tampon cacodylate 0,1 M pendant 1 h. Les lamelles avec des échantillons ont été lavées trois fois pendant 10 min avec de l'eau Milli-Q. Ensuite, les cellules ont été déshydratées séquentiellement avec des solutions d'éthanol pendant 10 min chacune : 50 %, 70 %, 2 × 90 %, 3 × 100 % (séchées sur des tamis moléculaires, Sigma-Aldrich, 69833). Les échantillons ont ensuite été recouverts d'un mélange 1:1 de résine (Electron Microscopy Sciences, anhydride dodécénylsuccinique, 13710, anhydride méthyl-5-norbornène-2,3-dicarboxylique, 19000, DMP-30, 13600 et industries de recherche LADD : résine LX112, 21310) et éthanol sec pendant 1 h. Ensuite, les échantillons ont été inclus dans de la résine pure pendant 1 h.

Des capsules d'enrobage (Electron Microscopy Sciences, 69910-10) ont été remplies de résine, inversées sur les lames de couverture et placées dans un four à 56 ° C pendant 24 h. Coupes 0,2 µm d'épaisseur ont été préparées à l'aide d'un microtome Leica Ultracut UCT. Exemples de coupes ont été déposés sur une puce de silicium propre (Institut des Fondamentaux de l'Électronique/CNRS et Université Paris Sud) et séchés à l'air avant d'être introduits dans la microsonde ionique NanoSIMS-50 (Cameca). Un ion primaire Cs⁺ a été utilisé pour générer un ion secondaire négatif à partir de la surface de l'échantillon. Les étapes de la sonde sur le champ d'image et le signal des espèces d'ions secondaires sélectionnées ont été enregistrés pixel par

pixel pour créer des images 2D. L'image du CN a été enregistrée pour fournir l'anatomie structure des cellules, tandis que celle de P met en évidence l'emplacement du noyau cellulaire. La distribution cellulaire du marqueur N a été imagée en mesurant l'excès de CN à $^{12}14-$ $^{12}15-$ rapport CN par rapport au niveau d'abondance naturelle (0,0037), et celui pour

anticorps avec coloration à l'or ciblant les mitochondries a été réalisé en détectant directement les ions Au. Lors de la détection d'ions CN, puissance de résolution de masse appropriée était nécessaire pour discriminer les ions isobares CN $^{13}14-$ $^{12}15-$ $^{197}-$ abondants (avec un M/ΔM de 4 272).

Pour chaque processus d'enregistrement d'image, le mode d'acquisition multiframe a été appliqué et des centaines de plans d'image ont été enregistrés. Le temps d'acquisition global correspondant à l'image N était de 12h et de 6h30 pour l'image Au. Lors du traitement d'image avec FIJI $^{197}-$ (2.0.0-rc-69/1.52n), les plans image successifs ont été correctement alignés à l'aide du plugin TomoJ, de manière à corriger le léger décalage du faisceau primaire pendant les longues heures d'acquisition. Une image sommée a ensuite été obtenue avec des statistiques améliorées. Plus loin,

pour la carte du rapport CN à CN, une image couleur HSI (Hue-Saturation-Intensity)

a été générée à l'aide d'OpenMIMS pour un affichage avec une signification accrue. La teinte

correspond à la valeur absolue du rapport $\frac{15}{14}$, et l'intensité à une teinte donnée est un indice de fiabilité statistique.

Interférence ARN

Des monocytes primaires humains ont été transfectés avec le kit Human Monocyte Nucleofector (Lonza, VPA-1007) conformément aux instructions du fabricant. 5×10^6 monocytes ont été remis en suspension dans 100 μ l de solution de nucléofector avec 200 pmol d'ARNsi ON-TARGETplus SMARTpool ou d'ARNsi de contrôle négatif (Qiagen, 1027310) avant la nucléofection avec Nucleofector II (Lonza). Les cellules ont ensuite été immédiatement retirées et incubées pendant une nuit avec 5 ml de milieu RPMI complet préchauffé (Gibco). Ce qui suit jour, GM-CSF a été ajouté au milieu. Les séquences des SMARTpools utilisées sont détaillées dans les [Informations Complémentaires](#).

Édition du génome

Le knock-out CRISPR a été réalisé en utilisant la stratégie suivante. Des monocytes primaires humains ont été transfectés avec le kit Human Monocyte Nucleofector (Lonza, VPA 1007). Cinq millions de monocytes ont été remis en suspension dans 100 μ l de solution de nucléofector avec un mélange de 100 pmol de CAS9 (Dharmacon, CAS12206) / 200 pmol de CD44 (Dharmacon, SQ 009999-01-0010) d'ARN à guide unique (sgRNA). Le mélange Cas9 – CD44 a été incubé pendant 10 min à 37 ° C avant la nucléofection avec Nucleofector II (Lonza). Les cellules étaient alors immédiatement retirées et incubées pendant une nuit avec 5 ml de milieu RPMI complet préchauffé (Gibco) et le lendemain, du GM-CSF a été ajouté au milieu. À jour 5, les cellules ont été activées avec du LPS (100 ng ml⁻¹, 24 h) et IFN γ (20 ng ml⁻¹, 24h). Au jour 6, les cellules ont été triées pour les populations CD44⁺ versus CD44⁻ avec BD FACSAria. La stratégie de tri et les séquences utilisées pour le sgRNA de CD44 (Edit-R Human Synthetic CD44, ensemble de 3, séquences cibles) sont détaillées dans le [Supplémentaire Information](#).

Microscopie à fond clair et photographies numériques

Les images en fond clair ont été acquises à l'aide d'un microscope CKX41 (Olympus) et du logiciel d'imagerie cellSens Entry (Olympus). Les images numériques ont été prises avec un iPhone 11 Pro (Apple).

Isolement des mitochondries

Les mitochondries ont été isolées à l'aide du kit d'isolement Qproteome Mitochondria (Qiagen, 37612) selon le protocole du fabricant. Les cellules ont été lavées et centrifugées à 500 g pendant 10 min et le surnageant a été éliminé. Les cellules étaient alors lavées avec une solution de NaCl à 0,9 % (Sigma-Aldrich, S7653-250G) et remis en suspension dans un tampon de lyse glacé et incubé à 4 °C pendant 10 min. Le lysat est ensuite centrifugé à 1 000 g pendant 10 min à 4 °C et le surnageant soigneusement retiré. Ensuite, le culot cellulaire a été remis en suspension dans un tampon de disruption. La rupture complète des cellules a été obtenue en utilisant un homogénéisateur Dounce (mitochondries pour ICP-MS) ou une aiguille à bout émoussé et une seringue (mitochondries pour la métabolomique). Le lysat a ensuite été centrifugé à 1 000 g pendant 10 min à 4 °C et le surnageant transféré dans un tube propre. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 6 000 g pendant 10 min à 4 °C pour obtenir des culots mitochondriaux.

Isolement des noyaux

Les noyaux ont été isolés à l'aide du Nuclei EZ Prep (Sigma-Aldrich, NUC101-1KT) selon aux instructions du fabricant. En bref, les cellules ont été traitées comme indiqué et recueillies au grattage et comptées. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X et lysées avec 1 ml de tampon de lyse Nuclei EZ glacé pendant 5 min sur de la glace. La suspension

a été centrifugé à 500g pendant 5 min à 4°C. Les noyaux résultants ont été lavés avec Nuclei Tampon de lyse EZ et centrifugé pour générer un culot de noyaux cellulaires isolés.

Isolement du réticulum endoplasmique

Les réticulums endoplasmiques ont été isolés à l'aide du kit d'extraction d'enrichissement du réticulum endoplasmique (Novus Biologicals, NBP2-29482) conformément aux instructions du fabricant. En bref, 500 µl de tampon d'homogénéisation isosmotique 1X suivi de 5 µl de PIC 100X ont été ajoutés à un culot de 10 cellules. La suspension résultante⁶ a été centrifugée à 1 000 g pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a été transféré dans un tube à centrifuger et centrifugé à 12 000 g pendant 15 min à 4 ° C. La couche lipidique flottante a été jeté. Le surnageant a été centrifugé dans un tube à centrifuger propre à l'aide d'une ultracentrifugeuse à 90 000 g pendant 1 h. La pastille résultante contenait le total fraction de réticulum endoplasmique (rugueux et lisse).

Spectroscopie RMN

¹Les spectres RMN H, RMN¹³C et RMN N ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 500 MHz à 298 K ou 310 K, et les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm en utilisant les signaux de solvant résiduel comme étalon interne. Pour mesurer l'interaction du tétrasaccharide hyaluronate avec le cuivre, des portions de 0,25 équivalent molaire d'une solution de CuCl dans DO (8,6 mg dans 599 µl D₂O) ont été ajoutées à une solution 2 mM de tétrasaccharide hyaluronate (TCI Chemicals, H1284) dans DO (1,0 mg de tétrasaccharide hyaluronate dans 600 µl DO) jusqu'à 1 équivalent molaire dans un tube²RMN. Ensuite, une goutte de l'acide trifluoroacétique (TFA, Alfa Aesar, A12198) a été ajouté. Dans un tube RMN séparé, un goutte de TFA a été ajoutée à une solution 2 mM sans cuivre de tétrasaccharide hyaluronate en D₂O. Pour mesurer l'oxydation du NADH en NAD⁺, ¹H RMN ont été enregistrés et les tubes ont été préparés comme suit : NADH (Sigma-Aldrich, N4505-100MG, 200 µM) ou NAD⁺ (Sigma-Aldrich, N0632-1G, 200 µM), imidazole (10 mM), CuSO (10 µM) ont été ajoutés

comme indiqué sur un tube RMN contenant du tampon phosphate de sodium dans D₂O (10 mM, pD 8,4, 981 µl) ou D₂O. H¹ RMN ont été enregistrés à 32,3 % D₂O (19 µl de solution diluée 100× de (w/w%) dans HO) a été ajoutée aux tubes RMN et la RMN H a été enregistrée après 1 h.

Synthèse chimique

Les produits ont été purifiés sur une HPLC préparative Quaternary Gradient 2545 équipée d'un détecteur Photodiode Array (Waters) équipé d'une colonne de phase inverse (XBridge BEH C18 OBD Prep column 5 µm 30 x 150 mm). Les spectres RMN ont été exécutés dans DMSO-d₆, chlorure de méthylène-d₂ ou méthanol-d₄ à 298 K sauf indication contraire. H¹ Les spectres RMN ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker à 400 ou 500 MHz. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm en utilisant des signaux résiduels de solvant non deutéré comme standard interne. Les abréviations suivantes sont utilisées : ex, échangeable ; s, singulet ; d, doublet ; t, triplet ; td, triplet de doublets ; m, multiplet. Les spectres C¹³ RMN ont été enregistrés à 100,6 ou 125,8 MHz, et les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm en utilisant le signal du solvant deutéré comme étalon interne. La pureté des composés finaux, déterminée à > 98 % par UPLC-MS, et les spectres de masse à basse résolution (LRMS) ont été enregistrés sur un Waters Acquity classe H équipé d'un détecteur à barrette de photodiodes et d'un détecteur SQ 2 (UPLC-MS) équipé d'une colonne de phase inverse (Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm, 2,1x50 mm). Les HRMS ont été enregistrés sur un Thermo Scientific Q-Exactive Plus équipé d'un Robotique TriVersa NanoMate Advion.

LCC-12

Du dicyandiamide (Alfa Aesar, A10451, 500 mg, 5,94 mmol), du 1,12-diaminododécane (Alfa Aesar, A04258, 500 mg, 2,50 mmol) et du CuCl (Sigma-Aldrich, 22.201-1, 249 mg, 1,85 mmol) ont été mis en suspension dans de l'eau (6 ml) dans un tube scellé et agité pendant 1 h à température ambiante, puis chauffé à 80 °C pendant 48 h. Le mélange rose résultant a été filtré et le solide a été remis en suspension dans de l'eau (10 ml). HS, généré à partir de l'ajout goutte à goutte de HCl aqueux (aq.) à 37 % (Supelco, 1.00317.100) sur FeS (poudre ~ 100 mesh,

Alfa Aesar, 17422), a été passé dans le mélange jusqu'à ce qu'il devienne noir. Le noir

Le mélange a été filtré et le filtrat a été acidifié à pH 5 avec une solution aq. solution de HCl. Le solvant est évaporé sous pression réduite. LCC-12 a été purifié par HPLC préparative (HO:acétonitrile:acide formique, 95:5:0,1 à 0:100:0,1) pour donner LCC

12 sel d'acide diformique sous forme de poudre blanche (280 mg, 24¹%). RMN H (500 MHz, DMSO-d) δ : 8,80–8,08 (m, 2H, ex), 8,47 (s, 2H, formiate), 7,60–6,78 (m, 12H, ex), 3,14–2,93 (m, 4H), 1,55–1,34 (m, 4H), 1,32–1,18 (m, 16H) ppm. RMN C (125,8 MHz, DMSO-d) δ : 167,2 (formiate), 160,3, 159,2, 41,3, 29,5 (3C), 29,2, 26,8 ppm. HRMS (ESI+) m/z : calculé pour CHN [M+2H] 185,1635, trouvé 185,1637, 2+

LCC-4,4

Bis-(cyanoguanidino)butane (200 mg, 0,90 mmol) et chlorhydrate de butylamine

(TCI Chemical, B0710, 197 mg, 1,80 mmol) ont été mélangés dans un tube scellé et

chauffé à 150 °C sans solvant pendant 4 h. Après refroidissement à température ambiante, le

mélange a été repris dans de l'éthanol et un large excès d'acétate d'éthyle a été ajouté. Le précipité

blanc a été filtré et purifié par HPLC préparative (HO:acétonitrile:acide formique,

100:0:0,1 à 50:50:0,1) pour donner le LCC-4,4 di-formique.

sel acide sous forme de poudre blanche (130 mg, 31¹%). RMN H (400 MHz, DMSO-d) δ : 8,82–7,77 (m, 4H, ex), 8,46 (s, 2H, formiate), 7,36–6,80 (m, 8H, ex), 3,16–2,99 (m, 8H), 1,58–1,37

(m, 8H), 1,37–1,20 (m, 4H), 0,86 (t, J = 6,8 Hz, 6H) ppm. RMN C (100,6 MHz, DMSO d) δ : 167,3

(formiate), 159,1 (2C), 40,9 (2C), 31,6, 26,8, 20,0, 14,1 ppm. SIRH (ESI+)

m/z : calculé pour CHN [M+2H] 185,1635, trouvé 185,1636.

La synthèse du bis-(cyanoguanidino)butane a été adaptée d'un

procédure publiée. Du 1,4-diaminobutane (Acros Organics, 112120250, 554 mg, 5,68 mmol) a été dissous

dans de l'eau et agité avec une solution aqueuse à 37 %. HCl pendant 10 min dans la chambre

température. Le solvant a été évaporé sous pression réduite et le sel résultant a été mis en suspension

dans du butanol (5 ml) avec du dicyanamide de sodium (Sigma-Aldrich, 178322, 1,09 g, 11,4

mmol) et agité à 140 °C pendant une nuit. Après filtration, le solide a été lavé avec du butanol et de

l'eau froide et recristallisé dans l'eau pour donner le bis-(cyanoguanidino)butane sous la forme d'une poudre

blanche (350 mg, 27 %). RMN H (500 MHz, DMSO

δ : 7,62–6,12 (m, 6H, ex), 3,23–2,85 (m, 4H), 1,71–1,15 (m, 4H) ppm. RMN¹³C (125,8 MHz, DMSO-d₆) δ : 161,6, 118,8, 40,9, 26,8 ppm.

LCC-12,4

Le bis-(cyanoguanidino)dodécane (227 mg, 0,60 mmol) et le chlorhydrate de but-3-yne-1-amine (Enamine, EN300-76524, 126 mg, 1,20 mmol) ont été mélangés dans un tube scellé et chauffés à 150 °C sans solvant pendant 4 h. Après refroidissement à température ambiante, le mélange a été repris dans de l'éthanol et un large excès d'acétate d'éthyle a été ajouté lentement. Le précipité blanc a été filtré et purifié par HPLC préparative (HO:acétonitrile:acide formique, 95:5:0,1 à 40:60:0,1) pour donner le sel d'acide diformique LCC-12,4 sous forme de poudre blanche (102 mg, 30 %). RMN H (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 9,05–7,95 (m, 4H, ex), 8,47 (s, 2H, formiate), 7,60–6,60 (m, 8H, ex), 3,29–3,16 (m, 4H), 3,11–3,00 (m, 4H), 2,84 (s, 2H), 2,39–2,29 (m, 4H), 1,49–1,38 (m, 4H), 1,33–1,18 (m, 16H) ppm. C¹³ RMN (125,8 MHz, DMSO-d₆) δ : 167,6 (formiate), 159,7, 158,5, 82,6, 72,7, 41,3, 40,3, 29,5 (3C), 29,2, 26,8, 19,4 ppm. HRMS (ESI+) m/z : calculé pour CHN [M+2H]²⁺ 237,1948, trouvé 237,1947.

La synthèse du bis-(cyanoguanidino)dodécane a été adaptée à partir d'une procédure précédemment publiée.⁵⁹ Du 1,12-diaminododécane (500 mg, 2,5 mmol) a été dissous dans un mélange d'eau et de méthanol et agité avec une solution aqueuse à 37 %. HCl pendant 10 min à température ambiante. Le solvant a été évaporé sous pression réduite et le sel résultant a été mis en suspension dans du butanol (2,5 ml) avec du dicyanamide de sodium (444 mg, 5,0) et agité à 140°C pendant une nuit. Après filtration, le solide est lavé avec du butanol et eau froide et recristallisé dans un mélange eau:éthoxyéthanol(2:1) pour donner le bis-(cyanoguanidino)dodécane sous forme de poudre blanche (365 mg, 44%). RMN H (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 7,21–6,18 (m, 6H, ex), 3,11–2,94 (m, 4H), 1,49–1,34 (m, 4H), 1,33–1,14 (m, 16H) ppm. RMN C¹³ (100,6 MHz, DMSO-d₆) δ : 161,6, 118,8, 41,0, 29,4 (3C), 29,2, 26,7 ppm.

LCC-12 marqué isotopiquement

¹⁵Dicyandiamide N- et C-marqué (Eurisotop, CNLM-9324-PK, 50 mg, 0,55 mmol),

Du 1,12-diaminododécane (46,8 mg, 0,23 mmol) et du CuCl (31,4 mg, 0,23 mmol) ont été mis en suspension dans un tube scellé dans de l'eau (0,6 ml) et agités pendant 1 h à température ambiante,

puis chauffé à 80 °C pendant 48 h. Le mélange rose résultant a été acidifié avec une solution aq. solution de HCl (2 M, 1 ml) jusqu'à dissolution complète du précipité. Le mélange a été concentré sous pression réduite et le LCC-12 marqué isotopiquement a été purifié par HPLC préparative (HO:acétonitrile:acide formique, 95:5:0,1 à 73:27:0,1) pour donner l'acide diformique LCC-12 marqué isotopiquement. sel sous forme de poudre blanche (35 mg, 32 %). RMN H (500 MHz, DMSO-d) δ : 8,60–7,76 (m, 2H, ex), 8,48 (s, 2H, formiate),

6

7,70–6,30 (m, 12H, ex), 3,12–2,95 (m, 4H), 1,53–1,35 (m, 4H), 1,33–1,18 (m, 16H) ppm.

¹³C RMN (125,8 MHz, DMSO-d) δ : 167,0 (formiate), 160,2, 159,2, 41,3, 29,5 (3C), 29,2,

26,8 ppm. RMN N (50,7 MHz, DMSO-d) δ : 156,2, 84,1 (2N), 81,2 ppm. SIRH (ESI+)

m/z : calculé pour CCHNN [M⁺H]⁺ 381,3095, trouvé 381,3093. 8

Alcyne trientine

Sous atmosphère d'argon, du dichlorhydrate de trientine (Santa Cruz Biotechnology, sc 216009, 0,050 g, 0,228 mmol) a été dissous dans du méthanol anhydre à 0 °C suivi de l'ajout de 4-(prop-2-ynyloxy)-benzaldéhyde (0,073 mg, 0,456 mmol) et des tamis moléculaires 4 Å. Le mélange a été agité pendant 3 h à température ambiante, avant l'ajout de NaBH CN (0,026 g, 0,684 mmol) et agité pendant une nuit à température ambiante. Ensuite, le mélange réactionnel a été filtré, le filtrat a été évaporé

sous pression réduite et purifiée par HPLC préparative (HO:acétonitrile:formique

acide, 95 : 5 : 0,1 à 73 : 27 : 0,1) pour donner l'alcyne trientine sous forme de poudre blanche (20,7 mg, 21 %).

¹RMN H (500 MHz, méthanol-d) δ : 7,40–7,33 (m, 4H), 7,06–6,99 (m, 4H), 4,74 (d, J =

2,4 Hz, 4H), 3,97 (s, 4H), 3,00–2,91 (m, 10H), 2,87 (s, 4H). C RMN (125,8 MHz,

Méthanol-d) δ : 159,4, 131,7 (2C), 128,7, 116,4 (2C), 79,6, 76,9, 56,7, 52,4, 47,7, 46,8 (2C).

(ESI+) m/z : calculé pour CHNO [M⁺H]⁺ 435,2755, trouvé 435,2758.

Sonde de cuivre(II) lysosomale

La sonde lysosomale de cuivre (II) Lys-Cu a été synthétisée comme indiqué précédemment et

les données spectrales sont en accord avec la littérature . ²⁶ ¹ RMN H (400 MHz, méthylène

chlorure-d) δ : 8,69–8,59 (m, 2H), 8,31 (dd, J = 8,5, 1,2 Hz, 1H), 8,04 (d, J = 1,5 Hz, 1H), 7,82–7,69 (m, 2H), 7,64 (dd, J = 7,8, 1,7 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 6,60 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,45 (d, J = 2,5 Hz, 2H), 6,38 (dd, J = 8,9, 2,6 Hz, 2H), 4,33 (t, J = 6,8 Hz, 2H), 3,74 (s, 2H), 3,65–3,62 (m, 4H), 3,40–3,34 (m, 9H), 2,69 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 2,56 (s, 3H), 1,19 (t, J = 7,1 Hz, 12H).

Sonde mitochondriale en cuivre(II)

La sonde de cuivre (II) mitochondriale M -2_{Ac} a été synthétisée comme indiqué précédemment et les données spectrales sont en accord avec la littérature [39](#) ¹ RMN H (400 MHz, DMSO d₆) δ : 9,89 (s, 1H), 8,07–7,67 (m, 16H), 7,58–7,45 (m, 2H), 7,02–6,93 (m, 1H), 6,80 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 6,62 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 6,58–6,36 (m, 4H), 4,44 (s, 2H), 4,08 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,75–3,58 (H, 2H), 2,02–1,83 (H, 2H), 1,83–1,60 (H, 2H).

Hyaluronate méthylé

L'hyaluronate méthylé (meth-HA) a été synthétisé à l'aide de 25,55 méthodes. En bref, 1 g de hyaluronate de sodium (600–1 000 kDa) a été dissous une nuit dans 200 ml d'eau distillée à température ambiante. Ensuite, une résine échangeuse de cations amberlite ⁺(H) (10 g) a été ajoutée à la solution et agitée pendant un jour à température ambiante. La résine a ensuite été filtrée de la solution. La solution résultante a ensuite été neutralisée à l'aide d'hydroxyde de tétrabutylammonium (TBAOH) pour obtenir du TBA-hyaluronate de (tétrabutylammonium) comme suit : du TBAOH, dilué cinq fois avec de l'eau, a été ajouté goutte à goutte à la solution d'acide hyaluronique précédemment préparée. jusqu'à ce que le pH atteigne 8. La solution a ensuite été lyophilisée et le TBA-hyaluronate a été conservé dans un congélateur jusqu'à une utilisation ultérieure. 0,530 g de TBA-hyaluronate ont été dissous dans 10 ml de DMSO à 30 °C, puis 1,5 ml d'iodure de méthyle ont été ajoutés et la solution a été maintenue à 30 °C pendant la nuit. Le mélange résultant a été versé lentement dans 200 ml d'acétate d'éthyle sous agitation constante. Le précipité blanc obtenu est filtré et lavé quatre fois avec 100 ml d'acétate d'éthyle et enfin séché sous vide pendant 24 h à température ambiante. La méthylation du hyaluronate a été confirmée par spectroscopie RMN H et chromatographie d'exclusion de taille. Les spectres RMN H ont été acquis sur un spectromètre Bruker 400 MHz dans DO contenant du deutéroxyde de sodium 0,125 M pour

augmenter la mobilité des protons hyaluronate, améliorant ainsi la résolution des spectres. RMN H¹
Le spectre affiche des pics de méthyl NHCOMe à 1,79–1,86 ppm, ainsi que des pics de groupes méthyle OMe à 2,61, 2,78 ppm et COOMe à 3,22 ppm.

Caractérisation structurale informatique des complexes de Cu à base de metformine

La structure de départ de Cu(Met) était basée sur la structure aux rayons X publiée. Les géométries de départ des autres complexes de cuivre(II) ont été obtenues par recherche de conformation dynamique (Gabedit, potentiel ambre99 (réf.)).⁵⁶ Pour chaque complexe, les dix géométries aux plus faibles énergies issues de la recherche en dynamique moléculaire ont été réoptimisées à l'aide de MOPAC2016 (PM7 (réf.)), COSMO water⁵⁷ (réf. ⁵⁸), TPSSh/D3BJ/Def2-TZVP en utilisant Orca 4.2.1 (réf.). Nous avons effectué un benchmark⁵⁹ étude basée sur la structure de Cu(Met) à l'aide de B3LYP⁶⁰, M062X⁶¹, TPSSh, BHLYP^{62,63} fonctionnelles avec l'ensemble de base Def2-TZVP utilisant la correction de dispersion D3BJ et le^{64,65} Modèle CPCM de solvatation de l'eau. Nous avons également utilisé la fonctionnelle BHLYP avec le SVP⁶⁶ ensemble de base et le modèle de solvatation de l'eau SMD, qui a été recommandé dans le⁶⁷ littérature pour les complexes de cuivre(II).⁶⁸

Calcul de l'énergie du transfert d'hydrure catalysé par le cuivre (II) vers HO₂ à partir de NADH

La fonctionnelle UBHLYP a été utilisée associée au jeu de base SVP et au^{64,65} Modèle de solvatation SMD^{69,70} pour représenter une méthode adéquate pour décrire l'espèce [Cu(HO₂)₂]²⁺. Ainsi, toutes les structures (minima et états de transition) ont été⁶⁸ optimisées à l'aide de l'ensemble de programmes Gaussian 16 au niveau UBHLYP/SVP pour tous atomes (état de spin doublet). Le modèle de solvatation SMD (eau) a été appliqué au cours du processus d'optimisation. La correction thermique de l'énergie libre de Gibbs a été calculée à 310,15 K. Des points uniques au niveau UMP2/SVP ont été réalisés. Les résultats présentés

sont ΔG en kcal mol⁻¹. MDHNA a été choisi comme modèle NADH pour étudier le cuivre(II)- 298 transfert d'hydrure catalysé vers HO₂.

HRMS des complexes biguanide-métal

Des solutions HRMS ont été préparées et injectées sans autre dilution. Une solution mère de LCC-12:K₂CO₃ (1:2) (100 μM) ou de metformine:K₂CO₃ (1:1) (200 μM) a été préparée dans du méthanol de qualité analytique. Solutions mères de métaux, CuCl₂·2H₂O (Acros Organics, 405840050, 100 μM), MnCl₂ (Sigma-Aldrich, 244589, 100 μM), CaCl₂·2H₂O (Acros Organics, 423520250, 100 μM), FeCl₃·xH₂O (Alfa Aesar, 12357, 100 μM), MgCl₂·6H₂O (Prolabo, 25 108.295, 100 μM), NiCl₂ (Alfa Aesar, 53131, 100 μM) et ZnCl₂ (Sigma Aldrich, 429430, 100 μM) ont été préparés dans de l'eau milliQ. Les solutions HRMS ont été préparées dans du méthanol (80 μl) avec du LCC-12:K₂CO₃ (10 μl) et le métal concerné (10 μl) avec un rapport 1:1, ou avec metformine:K₂CO₃ (10 μl) et CuCl₂·2H₂O (10 μl) avec un rapport 2:1 rapport.

Expériences de titrage UV

A une solution de LCC-12 (5 μM) dans HEPES (10 mM), des portions de 0,1 équivalent molaire d'une solution de CuCl₂ dans HEPES (10 mM) ont été ajoutées jusqu'à 3 équivalents molaire. Les spectres UV ont été enregistrés sur un système de spectrophotomètre Analytik Jena UV / VIS specord 205 à température ambiante dans la plage de 200 à 1000 nm à l'aide d'une micro cuvette (quartz Excellence Q 10 mm). Tous les spectres ont été blanchis contre le tampon HEPES.

Oxydation du NADH catalysée par le cuivre

La cinétique d'oxydation du NADH (Sigma-Aldrich, N4505) a été suivie en mesurant l'absorbance à 340 nm à l'aide d'un spectromètre Cary 300 UV-Vis. Les mesures ont été enregistrées à 37°C contrôlées avec un contrôleur de température Pelletier Cary (Agilent Technologies). Solutions mères de NADH (1 mM), imidazole (Sigma-Aldrich, 56750, 100 mM), CuSO₄ (Sigma-Aldrich, 451657, 500 µM), LCC-12 (10 mM ou 1 mM), metformine·HCl (Alfa Aesar, J63361, 100 mM ou 10 mM) et LCC-4,4 (10 mM) ont été préparé dans un tampon phosphate de sodium 10 mM ajusté à pH 8,0. La concentration de HO₂ (Sigma-Aldrich, 16911, 32,3 % wtin HO) a été déterminée par titrage avec KMnO₄ et diluée 100 fois dans le tampon phosphate. Dans des cuvettes jetables, 1 ml de solutions expérimentales ont été préparées en utilisant un tampon de phosphate de sodium et respectivement solutions mères pour atteindre les concentrations finales décrites Fig. 3f, en ajoutant : NADH (200 µl), imidazole (100 µl), CuSO₄ (20 µl), LCC-12 (20 µl), LCC-4,4 (20 µl) ou metformine (40 µl) comme indiqué, et solution HO₂ (19 µl) att. La concentration de NADH a été calculée à partir de l'absorbance mesurée à 340 nm et de sa valeur molaire coefficient d'extinction.

Mesure des concentrations de NADH

Les concentrations absolues de NADH ont été mesurées à l'aide d'un dosage fluorimétrique (Abcam, ab176723) selon le protocole du fabricant. Au moins 500 000 cellules ont été collectées par condition. Les cellules flottantes ont été collectées et les cellules adhérentes ont été lavées avec 1 × PBS. Les cellules adhérentes ont été incubées avec 1X PBS avec 10 mM EDTA puis gratté et mis en commun avec les cellules flottantes collectées. Les cellules étaient ensuite lavé avec du PBS 1× glacé et compté, puis centrifugé à 1 500 rpm pendant 5 min et le surnageant jeté. Le culot a ensuite été remis en suspension dans 100 µl de tampon de lyse (composant du kit) et incubé à 37 °C pendant 15 min. Les solutions d'extraction NAD⁺ et NADH ainsi que les solutions de contrôle NAD⁺/NADH (composants du kit) ont été ajouté et incubé à 37 °C pendant 15 min à un volume de 15 µl d'échantillon pour 15 µl des tampons respectifs (composants du kit). Les réactions ont été arrêtées en utilisant 15 µl de tampons respectifs (composants du kit). Enfin, 75 µl de mélange réactionnel NAD⁺/NADH (mélange d'enzymes de recyclage NAD⁺/NADH et tampon de capteur, composants du kit) ont été

ajouté et les mélanges résultants incubés pendant 1 h à température ambiante.

Les intensités de fluorescence (excitation 540 nm; émission 590 nm) ont été enregistrées à l'aide d'un lecteur de microplaques Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2. Les valeurs ont été dérivées de la courbe standard de chaque expérience et comparée aux données obtenues par métabolomique basée sur la spectrométrie de masse, pour calculer le NADH total et mitochondrial concentrations.

Métabolomique quantitative

Dans une expérience typique, 1,5 million de cellules ont été utilisées pour les extraits totaux et 15 millions de cellules pour les extraits mitochondriaux. Les cellules ont été recueillies et le surnageant retiré pour générer les culots cellulaires correspondants. Par la suite, les culots ont été séchés et additionnés de 300 µl de méthanol, vortexés 5 min et centrifugés (10 min à 15 000 g, 4 °C). Ensuite, la phase supérieure du surnageant a été scindée en deux parties : 150 µl ont été utilisés pour la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) dans des microtubes d'expérimentation et les 150 µl restants ont été utilisés pour la chromatographie liquide à ultra haute pression-spectrométrie de masse (UHPLC-MS). Pour les aliquotes GC-MS, les surnageants ont été complètement évaporés de l'échantillon. 50 µl de méthoxyamine (20 mg/ml dans de la pyridine) ont été ajoutés aux extraits secs, puis conservés à température ambiante dans l'obscurité pendant 16 h. Le jour suivant, 80 µl de N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide ont été ajoutés et la dérivation finale s'est produite à 40 °C pendant 30 min. Les échantillons ont ensuite été transférés dans des flacons et directement injectés pour GC-MS.

Analyse MS. Pour les aliquotes UHPLC-MS, 150 µl ont été séchés dans des microtubes à 40 °C dans un concentrateur à assistance pneumatique (Techne DB3). Les extraits séchés UHPLC-MS ont été solubilisés avec 200 µl d'eau MilliQ. Les aliquotes pour analyse ont été transférées dans des flacons de chromatographie liquide et injectées dans UHPLC-MS ou conservées à -80 °C jusqu'à l'injection.

Analyse largement ciblée des métabolites intracellulaires par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle (QQQGC-MS) : la méthode GC-MS/MS a été réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse 7890A (Agilent Technologies) couplé à un triple quadripôle 7000C (Agilent Technologies) équipé d'une source d'impact électronique Haute sensibilité fonctionnant en mode positif. Détection des pics et

l'intégration des analytes a été effectuée à l'aide de l'Agilent Mass Hunter logiciel quantitatif (B.07.01). Analyse ciblée des nucléotides et des cofacteurs par chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) couplée à un spectromètre de masse Triple Quadripôle (QQQ) : l'analyse ciblée a été réalisée sur un système RRLC 1290 (Agilent Technologies) couplé à un Triple Quadripôle 6470 (Agilent Technologies) équipé d'une source d'électronébulisation fonctionnant en modes négatif et positif. La température du gaz a été réglée sur 350 °C avec un débit de gaz de 12 l min. La tension capillaire a été réglée sur 5 kV en mode positif et 4,5 kV en mode négatif. Dix microlitres d'échantillon ont été injectés sur une colonne Zorbax Eclipse XDB-C18 (100 mm × 2,1 mm granulométrie 1,8 µm) d'Agilent Technologies, protégée par une colonne de garde XDB-C18 (5 mm × 2,1 mm granulométrie 1,8 µm) et chauffée à 40°C par un four à granulés.

La phase mobile du gradient était constituée d'eau avec 2 mM d'acétate de dibutylamine concentré (DBAA)(A) et acétonitrile (B). Le débit a été réglé sur 0,4 ml min et un gradient initial de 90 % de phase A et 10 % de phase B, qui a été maintenu pendant 3 min. Les molécules ont ensuite été éluées à l'aide d'un gradient de 10% à 95% de phase B en 1 min. La colonne a été lavée avec une phase mobile B à 95 % pendant 2 min et équilibrée avec une phase mobile B à 10 % pendant 1 min et l'échantillonneur automatique a été maintenu à 4 °C. Le mode de balayage utilisé était le MRM pour les échantillons biologiques. La détection des pics et l'intégration des analytes ont été réalisées à l'aide du logiciel quantitatif Agilent Mass Hunter (B.10.1).

Analyse pseudo-ciblée de métabolites intracellulaires par UHPLC couplée à un spectromètre de masse Q-Exactive. Méthode à l'acétonitrile en phase inversée : l'expérience de profilage a été réalisée avec un système UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) couplé à un Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) équipé d'une source d'électrospray fonctionnant en modes positif et négatif et en mode balayage complet de 100 à 1 200 m/z. Les paramètres Q-Exactive étaient : débit de gaz gaine 55 µl min, débit de gaz auxiliaire 15 µl min, tension de pulvérisation 3,3 kV, température capillaire 300 °C, niveau RF S-Lens 55 V. Le spectromètre de masse a été calibré avec une solution d'acétate de sodium dédiée à un étalonnage de faible masse. 10 µl d'échantillon ont été injectés sur une colonne SB-Aq (100 mm × 2,1 mm granulométrie 1,8 µm) d'Agilent Technologies, protégée par une colonne de garde XDB-C18 (5 mm × 2,1 mm granulométrie 1,8 µm) et chauffée à 40 °C par un four à granulés.

La phase mobile du gradient était constituée d'eau avec 0,2 % d'acide acétique (A) et d'acétonitrile (B). Le débit a été réglé sur 0,3 ml min. L'état initial était de 98 % phase A et 2% de phase B. Les molécules ont ensuite été éluées à l'aide d'un gradient de 2% à 95%

phase B pendant 22 min. La colonne a été lavée avec de la phase mobile B à 95% pendant 2 min et équilibré avec 2% de phase mobile B pendant 4 min. L'échantillonneur automatique a été maintenu à 4 °C. La détection et l'intégration des pics ont été réalisées à l'aide du logiciel quantitatif Thermo Xcalibur (2.1.). [73](#)

Protéomique quantitative

Les cellules ont été cultivées et traitées comme indiqué. Des extraits de cellules entières ont été collectés par grattage après incubation avec du PBS 1 × avec EDTA 10 mM à 37 ° C. Après centrifugation à 1 500 g pendant 5 min à 4 ° C, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1 × glacé et lysées à l'aide d'un tampon de lyse (urée 8 M, NH₄HCO₃ 200 mM, complet) pendant 1 h à 4 ° C sur rotor. Après centrifugation à 20 000 g, 4 ° C pendant 20 min, les surnageants contenant des protéines ont été utilisés pour l'analyse globale du protéome. En bref, le protéome global a été analysé quantitativement avec un spectromètre de masse Orbitrap Eclipse en utilisant un marqueur approche libre. Environ 10 µg de lysat cellulaire protéique total ont été réduits par incubation avec du dithiothréitol (DTT) 5 mM à 57 ° C pendant 30 min, puis alkylés avec de l'iodoacétamide 10 mM pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Les échantillons ont ensuite été dilués avec 100 mM de bicarbonate d'ammonium pour atteindre une concentration finale de 1 M urée et digérés pendant une nuit à 37°C avec Trypsin:Lys-C (Promega, V5071) à un rapport de 1:50. Les échantillons ont ensuite été chargés sur un StageTips C18 fait maison pour le dessalage. Les peptides ont été élués des billes par incubation avec 40:60 acétonitrile:eau avec 0,1% d'acide formique. Les peptides ont été séchés dans un Speedvac et reconstitués dans 10 µl de 0,3% TFA avant chromatographie liquide-spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) analyse. Des échantillons de 4 µl ont été séparés par chromatographie à l'aide d'un RSLCnano (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific) couplé en ligne à un spectromètre de masse Orbitrap Eclipse (Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été chargés en premier sur une colonne piégée C18 (75 µm de diamètre intérieur × 2 cm ; nanoViper Acclaim PepMap 100, Thermo Fisher Scientific), avec le tampon A (2:98 MeCN:HO avec 0,1 % d'acide formique) à un débit de 3 µl min pendant 4 min, puis commuté pour la séparation sur une colonne C18 (75 µm de diamètre intérieur × 50 cm ; nanoViper C18, 2 µm, 100 Å, Acclaim PepMap RSLC, Thermo Fisher Scientific) réglé à une température de 50 °C avec un

gradient linéaire de 2 à 30 % de tampon B (100 % MeCN et 0,1 % acide formique) à un débit de 300 nL min sur 211 min. Les données MS1 ont été collectées dans l'Orbitrap (résolution 120 000 ; temps d'injection maximal 60 ms ; AGC 4×10^5). Des états de charge entre 2 et 5 étaient nécessaires pour l'analyse MS2, et une fenêtre d'exclusion dynamique de 45 s a été utilisée.

Les scans MS2 ont été réalisés dans le piège à ions en mode rapide avec fragmentation HCD (fenêtre d'isolement 1,2 Da ; NCE 30 % ; temps d'injection maximum 60 ms ; AGC 10^4). L'identité des protéines a été établie à partir de la base de données canonique humaine UniProt (UP000005640_9606) en utilisant Sequest HT via Proteome Discoverer (version 2.4)

(Thermo Scientific). La spécificité enzymatique a été fixée à la trypsine et un maximum de deux sites de clivage manqués a été autorisé. Méthionine oxydée, Perte de méthionine,

La perte de méthionine-acétyle et l'acétylation N-terminale ont été définies comme des modifications variables.

La carbamidométhylation des cystéines a été définie comme une modification fixe. Maximum autorisé

l'écart de masse a été fixé à 10 ppm pour les ions précurseurs monoisotopiques et à 0,6 Da pour

Pics MS/MS. Les fichiers résultants ont ensuite été traités à l'aide de myProMS v3.9.3 ([https://](https://github.com/bioinfo-pf-curie/myproms)

github.com/bioinfo-pf-curie/myproms). Pour le calcul du taux de fausses découvertes (FDR), nous avons

utilisé Percolator et celui-ci a été réglé sur 1 % au niveau du peptide pour toute l'étude. La quantification

sans étiquette a été réalisée par peptide Extracted Ion Chromatograms (XICs) calculé avec MassChroQ

version 2.2.21 (réf.). Pour la quantification des protéines, des XIC de peptides protéotypiques partagés entre

des conditions comparées (appariement TopN) avec jusqu'à deux clivages manqués et des

modifications carbamidométhyl ont été utilisés. La normalisation de la médiane et de l'échelle a été appliquée sur le total

signal pour corriger les XIC pour chaque répétition biologique. Pour estimer l'importance de

le changement d'abondance des protéines, un modèle linéaire (ajusté sur les peptides et les réplicats

biologiques) a été réalisé et les valeurs P ont été ajustées avec une procédure Benjamini – Hochberg FDR

avec un seuil de contrôle réglé sur 0,05 et les protéines doivent avoir à

moins 3 peptides. ⁷⁵

Dosage du lactate

Le lactate extracellulaire a été quantifié à l'aide d'un test de lactate fluorométrique (Abcam, ab65330)

conformément aux instructions du fabricant. Les milieux de culture des cellules

a été recueilli et centrifugé à 500 g pendant 5 min. Le surnageant a ensuite été centrifugé à 20 000 g pendant 10 min. Le surnageant a ensuite été déprotéiné en utilisant des colonnes de spin de 10 kD (Abcam, ab93349). Un étalon de lactate a été préparé en ajoutant 5 µl de l'étalon de lactate de 100 nmol à 495 µl de tampon d'essai de lactate. Ensuite, 1 ml de standard de lactate à 0,01 nmol a été produit en diluant 10 µl de standard à 1 nmol dans 990 µl de tampon d'essai de lactate. Dans une plaque à 96 puits, des échantillons standard de 0 à 0,1 nmol par puits ont été ajoutés. Un mélange réactionnel de 46 µl de tampon d'essai au lactate, 2 µl de sonde et 2 µl de mélange d'enzymes a été préparé pour chaque puits. Pour les mesures de fond, 48 µl de tampon de test de lactate ont été mélangés avec 2 µl de sonde pour obtenir un mélange réactionnel de fond. Cinquante microlitres de chaque échantillon ont été ajoutés à une plaque à 96 puits et soit le mélange réactionnel ou le mélange réactionnel de fond a été ajouté. Les échantillons ont été incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Intensités de fluorescence (excitation 540 nm ; émission 590 nm) ont été enregistrées à l'aide d'un lecteur de microplaques Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2. Les valeurs ont été dérivées de la courbe standard.

Dosage du glycéraldéhyde 3-phosphate

Le glycéraldéhyde 3-phosphate (GA3P) a été quantifié à l'aide d'un kit de dosage fluorométrique du glycéraldéhyde 3-phosphate (Abcam, ab273344) adaptant le instruction du fabricant. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X puis collectées dans un tube de centrifugation dans 100 µl de tampon de dosage GA3P. Les échantillons ont été conservés sur de la glace pendant 10 min puis centrifugés à 10 000 × g pendant 10 min. Le surnageant a été recueilli puis déprotéiné à l'aide de colonnes de spin de 10 kD (Abcam, ab93349). Pour chaque essai échantillon, 10 µl d'échantillon ont été ajoutés dans trois puits parallèles dans un fond plat blanc 96-bien assiette. Un échantillon témoin de fond, un échantillon non dopé et dopé ont été ajoutés à ces trois puits. L'échantillon dopé contenait 200 pmol de standard GA3P. 50 µl de tampon de dosage GA3P ont été ajoutés par puits. Pour le blanc d'essai, 50 µl de tampon d'essai GA3P ont été ajoutés par puits. A chaque puits de fond, 50 µl d'un mélange réactionnel constitué de 46 µl de tampon de test GA3P, 2 µl de mélange d'enzymes GA3P et 2 µl de sonde GA3P ont été ajoutés. A chaque puits restant, 50 µl d'un mélange réactionnel ont été ajoutés, qui consistaient en 44 µl de tampon d'essai GA3P, 2 µl de révélateur GA3P, 2 µl de mélange d'enzymes GA3P et 2 µl de sonde GA3P. Fluorescence

les intensités (excitation 540 nm; émission 590 nm) ont été enregistrées à l'aide d'un Perkin Elmer Lecteur de microplaques Wallac 1420 Victor2. Plusieurs lectures ont été effectuées à 1 min d'intervalle. Les concentrations finales de GA3P ont été calculées en soustrayant les valeurs d'échantillon de fond.

Immunoessai Luminex

Les niveaux de cytokines ont été mesurés dans les surnageants de culture cellulaire à l'aide du panel inflammatoire V-Plex pro (MSD, K15049D-1). Le kit a été exécuté selon le protocole du fabricant et le signal de chimiluminescence a été mesuré sur un Sector Imager 2400 (MSD).

ARN-seq

Les ARN ont été extraits des MDM à l'aide du mini kit RNeasy (Qiagen, 74104). ARN des bibliothèques de séquençage ont été préparées à partir de 1 µg d'ARN total à l'aide d'Illumina TruSeq Kit de préparation de bibliothèque d'ARNm brin (Illumina, 20020594), qui permet le séquençage spécifique de brin. Une première étape de sélection de polyA à l'aide de billes magnétiques a été réalisée pour permettre le séquençage des transcrits polyadénylés. Après fragmentation, la synthèse d'ADNc a été effectuée et les fragments résultants ont été utilisés pour le dA-tailing suivi de la ligature des adaptateurs indexés TruSeq (Illumina, 20020492). Par la suite, une amplification par réaction en chaîne par polymérase a été réalisée pour générer les bibliothèques finales d'ADNc à code-barres. Le séquençage a été réalisé sur un instrument NovaSeq 6000 d'Illumina basé sur un mode 2 × 100 cycles (paired-end reads, 100 bases). Pour l'ARN seq sur les cellules des modèles murins in vivo, voir les paragraphes respectifs. Brut les lectures de séquençage ont d'abord été vérifiées pour la qualité avec Fastqc (0.11.8) et ajustées pour les séquences d'adaptateur avec le logiciel trimGalore (0.6.2). Les lectures coupées ont ensuite été aligné sur le génome humain de référence hg38 à l'aide du mappeur STAR (2.6.1b), jusqu'à la génération d'une table de comptage brute par gène (annotation GENCODE v29). Le

les pipelines bioinformatiques utilisés pour ces tâches sont disponibles en ligne (rawqc v2.1.0 :

<https://github.com/bioinfo-pf-curie/raw-qc.RNA-seq.v3.1.4> : <https://github.com/bioinfo-pf-curie/RNA-seq>).

L'analyse en aval a ensuite été

limité aux gènes codant pour les protéines. Les données de la littérature ont été converties en vrac en gardant les cellules annotées comme des macrophages, puis en additionnant les décomptes pour chaque

échantillon. Les données de comptage de la littérature ont été téléchargées à partir de GEO sous numéro d'accès [GSE73502](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE73502). Les données brutes de la littérature ont été téléchargées

du NCBI Short Read Archive sous les enregistrements [PRJNA528433](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/short-read-archive/record/PRJNA528433) et [PRJNA290995](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/short-read-archive/record/PRJNA290995) et traité comme

décrit ci-dessus. Pour *L. major*, nous avons utilisé des données à 4 h post-infection ; pour *A. fumigatus*, nous avons utilisé les données à 2 h après l'infection. Les comptages ont été normalisés à l'aide de la

normalisation TMM de edgeR (v 3.30.3). L'expression différentielle a été évaluée

avec le framework limma/voom (v 3.44.3) . La corrélation intra-donneur était

contrôlé en utilisant la duplicateCorrelation de limma. Gènes avec un P ajusté

valeur < 0,05 ont été étiquetés significatifs. L'analyse d'enrichissement à partir de gènes exprimés

de manière différentielle a été réalisée à l'aide de la fonction enrichGO du package

clusterProfiler v3.16.1.

ChIP-seq

Les cellules ont été cultivées et traitées comme décrit. Les cellules ont été centrifugées à 1 500 g pendant 5

min à température ambiante. Les cellules culottées ont été remises en suspension dans du milieu,

comptées et réticulées avec du formaldéhyde à 1 % pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, 2,5 M

la glycine a été ajoutée à une concentration finale de 0,125 M et incubée pendant 5 min à la pièce

température suivie d'une centrifugation à 1 500 g pendant 5 min à 4 ° C. Les cellules pastillées

ont été lavés deux fois avec du PBS 1X glacé et récupérés par centrifugation à 1 500 g pendant 5 min à 4 °

C. Les culots ont été remis en suspension dans du tampon de lyse A (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA,

1 % SDS, complet) et incubés pendant 30 min sur une roue rotative à 4 °C. Ensuite, les lysats ont été

centrifugés à 1 500 g pendant 15 min à 8 ° C pour éviter la précipitation du SDS, et les surnageants ont été

jetés. Les pastilles ont ensuite été cisailées dans du tampon B (25 mM Tris HCl pH 8, 3 mM EDTA, 0,1

% SDS, 1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, cOmplete) jusqu'à une taille moyenne d'environ 200 à

600 pb à l'aide d'un Bioruptor Pico (Diagenode). Après

centrifugation à 20 000 g à 4 ° C pendant 15 min, surnageants contenant cisailé chromatine ont été utilisés pour l'immunoprécipitation. Vingt-cinq microlitres (10 %) de chromatine cisailée ont été utilisés comme ADN d'entrée pour normaliser les données de séquençage. Comme contrôle supplémentaire pour la normalisation, le pic de chromatine de Drosophila (Active Motif, 53083) et un anticorps de pointe ont été utilisés. L'immunoprécipitation de la chromatine (1 million de cellules par condition CHIP) a été réalisée à l'aide de chromatine cisailée et d'anticorps contre des marques d'histones spécifiques, qui ont ensuite été complexés à des billes magnétiques revêtues de protéine G Dynabeads (Invitrogen, 10003D) pour H3K27ac, H3K14ac, H3K9ac, H3K27me3 et H3K9me2. En bref, chaque anticorps a été mélangé avec 1 µg d'anticorps de pointe. Ensuite, 22 µl de billes magnétiques ont été lavées trois fois dans du tampon glacé C (20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 0,1 % SDS, 1 % Triton X 100, 150 mM NaCl, cOmplete) et incubées avec le mélange d'anticorps pendant 4 h, à température ambiante sur roue tournante dans le tampon C (494 µl). Après avoir tourné et après élimination des surnageants, les billes ont été remises en suspension dans 50 µl de tampon C. Cette suspension a ensuite été incubée avec 250 µl de chromatine cisailée préalablement mélangée à 50 ng de chromatine spike-in de Drosophila (250 µl de chromatine d'intérêt : 2,5 µl de chromatine spike-in) à 4 ° C sur une roue en rotation pendant la nuit (16 h). Après une centrifugation, les surnageants ont été jetés et les billes ont été successivement lavées dans le tampon C (deux fois), le tampon D (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, SDS 0,1 %, Triton X-100 1 %, NaCl 500 mM), tampon E (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,25 M LiCl, 0,5 % NP-40, 0,5 % désoxycholate de sodium, 1 mM EDTA) et une fois dans le tampon F (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl).

Enfin, les échantillons de chromatine d'entrée et immunoprécipités ont été remis en suspension dans une solution contenant du tampon TE/SDS à 1 %, déréiculée par chauffage à 65 ° C pendant une nuit et soumise à la fois à la RNase A (Invitrogen, 12091-039, 1 mg/ml) et à la protéinase K (Thermo Scientific, EO0491, 20 mg/ml) traitement¹. Extraction d'ADN d'entrée et immunoprécipitée : après la réticulation inverse, les échantillons de chromatine d'entrée et immunoprécipités ont été traités avec de la RNase A et de la protéinase K, et du glycogène (Thermo Scientific, R0561, 20 mg/ml) a été ajouté. Les échantillons ont été incubés à 37 ° C pendant 2 h.

La précipitation de l'ADN a été effectuée en utilisant du LiCl 8 M (concentration finale 0,44 M) et du phénol : chloroforme : alcool isoamylique. Les échantillons ont été vortexés et centrifugés à 20 000 g pendant 15 min à 4 ° C. La phase supérieure a été mélangée avec du chloroforme au vortex.

Après centrifugation à 20 000 g pendant 15 min à 4 ° C, la phase supérieure a été mélangée avec de l'éthanol absolu à -20 ° C au vortex et stockée à -80 ° C pendant 2 h. Ensuite, des échantillons ont été

culotté à 20 000 g pendant 20 min à 4 ° C. Les granulés ont été lavés avec de la glace à 70% éthanol et centrifugé à 20 000 g pendant 15 min à 4 ° C. Les surnageants ont été jetés et les culots ont été séchés à température ambiante, dissous dans une solution sans nucléase.

l'eau et quantifié à l'aide d'un dosage fluorométrique Qubit (Invitrogen) selon le protocole du fabricant.

Préparation et séquençage de la bibliothèque : les bibliothèques compatibles Illumina ont été préparées à partir d'ADN d'entrée et immunoprécipités à l'aide du kit de préparation de bibliothèque Illumina TruSeq CHIP conformément au protocole du fabricant (IP-202-1012). En bref, 4 à 10 nanogrammes d'ADN ont été soumis à une réparation terminale, à une queue dA et à une ligature d'adaptateurs Illumina indexés TruSeq. Après une dernière étape d'amplification par PCR (avec 15 cycles), les bibliothèques à code-barres résultantes ont été regroupées de manière équimolaire et quantifiées par PCR quantitative à l'aide du kit de quantification de bibliothèque KAPA (Roche, 07960336001). Le séquençage a été réalisé sur le NovaSeq 6000 (Illumina),

ciblant 75 millions de grappes par échantillon et en utilisant des appariés 2 × 100 bp. ChIP-seq le traitement des données et les contrôles de qualité ont été effectués avec le pipeline Institut Curie ChIP-seq Nextflow (1.0.6) disponible sur https://github.com/bioinfo-pf_curie/ChIP-seq. En bref, les lectures ont été coupées pour le contenu de l'adaptateur et alignées sur le génome de référence humain hg38 avec BWA-mem. Les lectures cartographiées de faible qualité, les lectures alignées sur les régions de la liste noire ENCODE, les lectures alignées sur le génome de pointe et les lectures marquées comme doublons ont été éliminées de l'analyse. Les pistes Bigwig ont ensuite été générées avec des outils profonds et normalisées à 1 million de lectures pour tenir compte des différences de profondeur de séquençage. Afin d'intégrer les enrichissements des marques d'histones avec les données d'expression génique (RNA-seq), le signal ChIP-seq a été compté soit au niveau du site de début de transcription (± 2 kb) pour les marques d'histones permissives, soit au niveau du corps du gène pour les marques d'histones répressives. Les gènes codants de Gencode v34 ont été utilisés pour les annotations. Les données de comptage ChIP-seq ont ensuite été filtrées pour supprimer les comptages faibles et normalisés à l'aide des méthodes TMM (package edgeR R). Les changements de pli ont ensuite été calculés pour tous les gènes et donneurs.

Études animales in vivo

L'évaluation de la survie à l'aide du modèle de souris LPS a été réalisée à Fidelta (maintenant Selvita) conformément à la législation 2010/63/UE et nationale réglementant l'utilisation d'animaux de laboratoire dans la recherche scientifique et à d'autres fins (Journal officiel 55/13). Un comité institutionnel d'éthique de la recherche animale (CARE-Zg) a surveillé les procédures liées aux animaux pour s'assurer qu'elles ne compromettaient pas le bien-être des animaux.

Des expériences ont été réalisées sur des souris mâles BALB/c âgées de huit semaines. D'autres expériences impliquant des modèles de souris LPS et CLP ont été réalisées conformément aux lois françaises sur l'expérimentation animale (#2021072216346511) et approuvées par le Comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux de l'Université de Saint Quentin-en-Yvelines (C2EA-47). Ces expériences LPS ont été réalisées sur huit

des souris BALB/c mâles âgées d'une semaine et des souris SWISS mâles âgées de cinq semaines et des expériences impliquant le modèle CLP ont été réalisées sur des souris BALB/c mâles âgées de neuf semaines. Souris ont été hébergés dans une animalerie à la pointe de la technologie (2CARE, numéro préfectoral accord : A78-322-3, France). Pour les expériences impliquant le SRAS-CoV-2, des souris C57BL/6 mâles de 8 semaines exprimant l'ACE2 humain K18 ont été utilisées. Un modèle murin SARS-CoV-2 a été utilisé au sein de l'installation de niveau 3 de biosécurité de l'Institut Pasteur de Lille, après validation des protocoles par la commission locale d'évaluation des risques biologiques et dans le respect des réglementations nationales et institutionnelles en vigueur et des consignes éthiques (Institut Pasteur de Lille/B59-350009). Les protocoles expérimentaux utilisant des animaux ont été approuvés par le comité d'éthique institutionnel "Comité d'Ethique en Expérimentation Animale (CEEA) 75, Nord-Pas-de-Calais". L'animal

l'étude a été autorisée par le ministère de l'Éducation, de la Recherche et de l'Innovation sous numéro d'enregistrement APAFIS#25517-2020052608325772v3. Un modèle de souris SARS-CoV-2 a été utilisé au sein de l'installation de niveau 3 de biosécurité de l'Université de Toulouse. Ce les travaux ont été supervisés par un Comité institutionnel d'éthique de la recherche animale (Licence APAFIS#27729-2020101616517580 v3, Ministère de la Recherche, France (CEEA-001)), pour s'assurer que les procédures liées aux animaux ne compromettaient pas le bien-être animal.

Quatre souris par cage ont été logées dans un rack ventilé avec un élément d'enrichissement des médias.

Les souris de toutes les animaleries étaient logées dans des cages ventilées (température $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, humidité $55\% \pm 10\%$) avec libre accès à l'eau et à la nourriture selon un cycle lumière/obscurité de 12 h. Les compagnons de portée mâles ont été assignés au hasard à des groupes expérimentaux tout au long.

Modèle de septicémie induite par le LPS

L'évaluation de la survie a été menée à Fidelta (aujourd'hui Selvita). Du LPS (Sigma-Aldrich, L2630, 20 mg kg⁻¹) a été injecté par voie intrapéritonéale à des souris mâles BALB/c (âgées de 8 semaines).

Le LCC-12 (0,3 mg kg⁻¹, injection intrapéritonéale, n = 10) ou le véhicule (0,9 % NaCl, 10 ml kg⁻¹, injection intrapéritonéale, n = 10) ont été injectés 2 h avant la provocation au LPS, puis 24 h, 48 h, 72 h et 96 h après provocation. La dexaméthasone (10 mg kg⁻¹, gavage oral, n = 10) a été administrée 1 h avant la provocation au LPS. L'incidence de la mortalité a été surveillée toutes les 4 h jusqu'à 48 h, puis deux fois par jour. Les travaux de cytométrie, ICP-MS, western blot et ARN

les travaux suivants ont été effectués sur des souris mâles BALB/c âgées de huit semaines et sur des souris âgées de cinq semaines

souris SWISS mâles. Le modèle expérimental d'endotoxémie a été induit par injection

intrapéritonéale de LPS (5 mg kg⁻¹ chez des souris BALB/c (Escherichia coli O111:B4,

Sigma-Aldrich, L2630) ou 20 mg kg⁻¹ chez la souris SWISS (E. coli O55:B5, Sigma-Aldrich,

L2880)). Toutes les souris ont été réanimées avec 30 ml kg⁻¹ de poids corporel de solution saline

administrées par voie sous-cutanée 6 h après l'administration de LPS. LCC-12 (0,3 mg kg⁻¹) a été injecté par voie intrapéritonéale. Les souris ont été tuées 22 h après la provocation au LPS. La

température corporelle a été mesurée à 0 h, 6 h et 22 h après la provocation au LPS. Cytométrie en flux :

après l'euthanasie à 22 h post challenge LPS, les organes ont été perfusés avec du PBS/EDTA (1 ml g⁻¹, 2 mM, pH 7,4) et 10 ml de PBS 1X ont été injectés dans le péritoine. Le liquide péritonéal a ensuite été

recueilli et centrifugé pendant 5 min à 1 500 tr/min. Le culot a été remis en suspension dans du milieu RPMI contenant 2 % de sérum de veau fœtal (Dutscher,

S181H-100). Le liquide péritonéal a ensuite été lavé dans des plaques à 96 puits à 2 000 tr/min pendant

2 min, et les culots ont été mis en suspension dans du RPMI complet. Pour la protéine intracellulaire

coloration, les échantillons ont été incubés pendant 2 h dans du brefeldine A (BFA, 5 μg ml⁻¹, Invitrogen, 00-4506-51) avant coloration de surface avec Fixable Viability Dye eFluor 780 (Invitrogen, 65-0865-14)

suivi d'anticorps conjugués au fluorochrome (35 min à 4 °C). Les échantillons incubés avec du BFA ont été

fixés (Foxp3/Transcription factor Fix/Perm 4X, Cell Signaling, 44931S) pendant 20 min à 4 °C et

perméabilisés (Flow Cytometry Perm Buffer 10X, TONBO, TNB-1213-L150) avant la coloration intracellulaire.

Les anticorps utilisés étaient les suivants : CD11b-Pacific Blue (BioLegend, 101224), CD40-APC (BioLegend, 124612), CD45-BV510 (BioLegend, 103138), CD86-PE (BioLegend, 105007), CD170 (Siglec-F) -

PEeFluor 610 (eBioscience, 61-1702-80), F4/80-BV605 (BioLegend, 123133), IA/IE

AF700 (BioLegend, 107622), Ly6C-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, 128012) et Ly6G-PE/CY7

(BioLegend, 127618). Pour la coloration intracellulaire, NOS2-APC (eBioscience, 17-5920-82) a été utilisé. Les SPM correspondent aux cellules CD45 IA-IE CD11b F4/80 SiglecF.

Après lavage avec du PBS ou avec du tampon Perm, les données ont été acquises à l'aide d'un cytomètre en flux LSR Fortessa (BD Biosciences) et analysées avec FlowJo. logiciel v. 10.8.2. Des expériences d'ICP-MS ont été menées à l'aide de SPM comme décrit dans « ICP-MS ». Les données spécifiques aux tissus ont été normalisées par rapport au poids sec. Le tri des SPM a été effectué à l'aide des anticorps suivants : CD11b-Pacific Blue (BioLegend, 101224), F4/80-PE (TONBO, TNB50-4801-U100), Ly6C-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, 128012) et Ly6G- AF647 (BioLegend, 127610). Les SPM triés correspondaient aux cellules CD11b F4/80 Ly6C Ly6G et ont été isolés sur un BD FACSAria IIIu. ARN-seq : le

CD11b F4/80 Ly6C Ly6G a trié les SPM de 7 souris traitées au LPS (102283 SPM) et

de 8 souris SWISS traitées au LPS et au LCC-12 (66967 SPM) ont été centrifugées, puis remises

en suspension dans 350 µl de TCL (Qiagen, 1031576) et 1% de β-mercaptoéthanol. L'ARN total a été

extrait avec le kit Norgen Single Cell RNA Purification (Norgen, 51800). Des bibliothèques de séquençage

d'ARN ont été préparées à l'aide du kit SMARTer Stranded Total RNA-seq v2 —Pico Input Mammalian (Clontech/Takara, 634419). La quantité d'entrée d'ARN total était de 10 ng pour chaque condition. Une

première étape de fragmentation de l'ARN a été appliquée à l'aide d'un mélange de fragmentation

propriétaire à 94 ° C pendant 4 min. Après fragmentation, une synthèse d'ADNc indexé a été

réalisée. Ensuite, l'étape de ribodéplétion a été réalisée en utilisant

sondes spécifiques à l'ARNr de mammifère. Une amplification PCR (12 cycles) a été réalisée pour

amplifier les bibliothèques d'ADNc. La quantification de la bibliothèque et l'évaluation de la qualité

ont été effectuées à l'aide d'un test fluorométrique Qubit (Invitrogen, Q32854) avec dsDNA HS

(Haute sensibilité) Assay Kit et LabChip GX Touch utilisant une puce à ADN haute sensibilité (Perkin

Elmer, 760517, CLS760672). Les bibliothèques ont ensuite été regroupées de manière équimolaire

et quantifiées par PCR quantitative à l'aide du kit de quantification de bibliothèque KAPA (Roche,

07960336001). Le séquençage a été effectué sur un NovaSeq 6000 (Illumina) ciblant 100 millions de

clusters par échantillon et en utilisant des appariés 2 × 100 bp. Pour l'analyse, voir 'RNA-seq'. Les lectures

coupées ont été alignées sur le génome de référence mm10 de la souris.

Modèle de septicémie induite par le CLP

Des souris mâles BALB/c âgées de neuf semaines ont été utilisées pour ces expériences. Les animaux étaient anesthésiés par l'isoflurane (Forene). Après incision abdominale, le caecum a été ligaturé, ponctionné avec une aiguille de jauge (25G) et une petite quantité de matières fécales a été libérée. Pour le groupe fictif, après incision abdominale, le caecum a été manipulé mais n'a été ni ligaturé ni ponctionné. Après le retour du caecum dans l'abdomen, la cavité abdominale a été fermée en deux couches et les souris ont été réanimées avec 30 ml/kg de poids corporel de solution saline (0,9 % de NaCl) administrés par voie sous-cutanée. LCC-12 (0,3 mg/kg, injection intrapéritonéale) a été administré 4h, 24h, 48h, 72h et 96h suivant la création du CLP. L'incidence de la mortalité a été surveillée toutes les 2 h jusqu'à 120 h (sauf de 22 h à 6 h) après la création du CLP. La dexaméthasone a été administrée par voie intrapéritonéale à 1 mg/kg 5 min avant la CLP création. Des expériences ICP-MS ont été menées sur des SPM comme décrit dans 'ICP-MS'. Les données spécifiques aux tissus ont été normalisées par rapport au poids sec. Le tri des SPM a été effectué à l'aide des anticorps suivants : CD11b-Pacific Blue (BioLegend, 101224), F4/80-PE (TONBO, TNB50-4801-U100), Ly6C-PerCP/Cy5.5 (BioLegend, 128012) et Ly6G – AF647 (BioLegend, 127610). Les SPM triés correspondaient à Cellules⁺CD11b⁺F4/80⁺Ly6C⁺Ly6G⁻.

Modèle d'inflammation aiguë induite par le SARS-CoV-2

Souris C57BL/6 mâles K18-humaines exprimant l'ACE2 âgées de huit semaines (B6.Cg-Tg(K18-hACE2)2Prln/J) ont été achetés auprès de Jackson Laboratory. Les souris étaient anesthésiés par injection intrapéritonéale de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) puis infectés par voie intranasale avec 50 µl de DMEM contenant 5×10^6 TCID de hCoV-19_IPL_France² souche de SARS-CoV-2 (NCBI MW575140). LCC-12 était inoculé par voie intranasale (0,5 mg/ml, 50 µl) 6 h, 24 h et 48 h post-infection. Souris ont été tués au jour 4 post-infection. Tri cellulaire : souris K18-hACE2 (Jackson Laboratory,

mâle, 10 souris par groupe) ont été infectés sous anesthésie courte (isoflurane 4%), par la voie intranasale avec 10^5 PFU de SARS-CoV-2 (souche BetaCoV/France/IDF0372/2020). Pendant les 4 jours d'infection, les souris ont été surveillées quotidiennement pour la progression de la maladie. Au jour 4 post-infection, après une anesthésie terminale (kétamine 100 mg kg^{-1} et xylazine 10 mg kg^{-1} , injection intrapéritonéale), les tissus pulmonaires ont été prélevés et homogénéisés dans des GentleMACS C Tubes (Miltenyi Biotec) contenant 2,5 ml de milieu RPMI 1640 (Gibco) et collagénase (2,5 mg/ml à l'aide d'un dissociateur gentleMACS (Miltenyi Biotec). Les tissus pulmonaires ont ensuite été dissociés pendant 30 min à 37°C sous agitation, passés à travers un tamis cellulaire de $70 \mu\text{m}$ et procédé à la lyse des globules rouges avant coloration pour le tri cellulaire. Les cellules ont été colorées avec Fixable Viability Dye eFluor 780 (Invitrogen, 65-0865-14) suivi par des anticorps conjugués au fluorochrome (35 min à 4°C). Les anticorps utilisés étaient comme suit : CD11b-Pacific Blue (BioLegend, 101224), CD45-BV510 (BioLegend, 103138), CD170 (Siglec-F)-PE-eFluor 610 (eBioscience, 61-1702-80), F4/80-BV605 (BioLegend, 123133). Les MA correspondent aux cellules $\text{CD45}^+ \text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+ \text{SiglecF}^+$ et ont été isolés sur un BD FACSAria Fusion. Des expériences d'ICP-MS ont été menées dans des AM comme décrit dans « ICP-MS ». RNA-seq : la moitié du lobe droit a été homogénéisée dans 1 ml de tampon RA1 du kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel, 740955.250) contenant 20 mM de tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP). Les ARN totaux dans l'homogénat tissulaire ont été extraits avec le kit NucleoSpin RNA. L'ARN a été élué avec 60 μl d'eau. Pour les étapes suivantes, voir « ARN-seq ». Les lectures coupées ont été alignées sur la référence mm10 de la souris génome.

Logiciel d'illustration

Les illustrations ont été créées à l'aide de FIJI 2.0.0-rc-69/1.52n, Prism 8.2.0 et Adobe Illustrator 26.0.2 et BioRender.com. BioRender.com a été utilisé pour les Figs. [1a](#) et [5a](#) et [données](#) étendues Fig. [10g](#).

Quantification, analyse statistique et reproductibilité

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm sem ou de moyenne \pm sd comme indiqué. Dans les boîtes à moustaches, les boîtes représentent la plage interquartile et la médiane, et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Une couleur spécifique de points sur une boîte à moustaches représente un donneur distinct uniquement dans un panneau de figure donné. Chaque donneur ou souris représente un échantillon biologique indépendant. Le logiciel Prism 8.2.0 a été utilisé pour calculer les valeurs P à l'aide d'un test de Mann-Whitney bilatéral, d'un test t non apparié bilatéral, d'un test de Kruskal-Wallis avec le post-test de Dunn, d'une ANOVA bidirectionnelle ou d'un test de log-rank de Mantel-Cox comme indiqué. Prism 8.2.0

logiciel ou le langage de programmation R a été utilisé pour générer des graphiques représentations de données quantitatives, sauf indication contraire. Les valeurs P exactes sont indiquées sur les figures. Les tailles d'échantillon (n) sont indiquées dans les légendes des figures. Tous les expériences d'immunofluorescence ont été répétées avec au moins n = 3 donneurs avec résultats similaires. Western blot sur des macrophages isolés de souris a été réalisé sur des échantillons regroupés et effectué une fois par pool. Les changements morphologiques observés entre les naMDM et les aMDM ont été observés chez n = 128 donneurs et des images représentatives de n = 1 donneur sont affichées dans Extended Data Fig. 1c. L'imagerie NanoSIMS a été réalisée sur n = 1 donneur et une [image](#) représentative est affichée dans Extended Data Fig. 5b.

—

Disponibilité des matériaux

Les réactifs internes peuvent être mis à disposition dans le cadre d'un accord de transfert de matériel avec Institut Curie. Les demandes doivent être adressées à RR

Résumé des rapports

De plus amples informations sur la conception de la recherche sont disponibles dans le [Nature Portfolio Reporting](#)

[Résumé lié](#) à cet article.

Disponibilité des données

Les données RNA-seq et CHIP-seq sont disponibles sur Gene Expression Omnibus avec la référence d'accèsion [GSE160864](#). Les données brutes de protéomique de spectrométrie de masse ont été déposées auprès du Consortium ProteomeXchange via le référentiel partenaire PRIDE avec l'identifiant de jeu de données [PXD038612](#). Le numéro de donateur correspond à _____ l'ordre du prélèvement sanguin. Les données sources sont fournies avec ce document.

Disponibilité des codes

Les scripts d'analyse pour les données RNA-seq et CHIP-seq sont disponibles sur <https://github.com/bioinfo-pf-curie/MDMmetals>.

Les références

1. Lopez-Otin, C. & Kroemer, G. Signes distinctifs de la santé. *Cellule* 184, 1929-1939 (2021).
 2. Annane, D., Bellissant, E. & Cavaillon, J. M. Septic shock. *Lancet* 365, 63-78 (2005).
 3. Moore, JB & June, CH Syndrome de libération de cytokines dans le COVID-19 sévère. *Science* 368, 473-474 (2020).
 4. Park, MD, Silvin, A., Ginhoux, F. & Merad, M. Macrophages dans la santé et la maladie. *Cellule* 185, 4259-4279 (2022).
 5. Horby, P. et al. Dexaméthasone chez les patients hospitalisés atteints de Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 384, 693-704 (2021).
-

6. Annane, D. et al. Hydrocortisone plus fludrocortisone pour les adultes atteints de septique choc. *N. Engl. J. Med.* 378, 809–818 (2018).

7. Rudd, KE et al. Incidence et mortalité mondiales, régionales et nationales du sepsis, 1990–2017 : analyse pour l'étude sur la charge mondiale de morbidité. *Lancette* 395, 200–211 (2020).

8. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, CB & Seed, B. CD44 est le principal récepteur de surface cellulaire pour l'hyaluronate. *Cellule* 61, 1303-1313 (1990).

9. Hua, Q., Knudson, CB & Knudson, W. Internalisation de l'hyaluronane par chondrocytes se produit via l'endocytose médiée par les récepteurs. *J. Cell Sei.* 106, 365–375 (1993).

10. Toole, BP Hyaluronane : de la colle extracellulaire au repère péricellulaire. *Nat. Tour. Cancer* 4, 528–539 (2004).

11. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, PA CD44 : des molécules d'adhésion aux régulateurs de signalisation. *Nat. Rév. Mol. Cell Biol.* 4, 33–45 (2003).

12. Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, MA et Weinberg, RA EMT dans le cancer. *Nat. Tour. Cancer* 18, 128-134 (2018).

13. Guilliams, M. & Svedberg, FR Est-ce que l'empreinte tissulaire limite les macrophages plasticité? *Nat. Immunol.* 22, 118-127 (2021).

14. Puré, E. & Cuff, CA Rôle crucial du CD44 dans l'inflammation. *Tendances Mol. Méd.* 7, 213–221 (2001).

15. Teder, P. et al. Résolution de l'inflammation pulmonaire par CD44. *Sciences* 296, 155–158 (2002).

16. Bartolazzi, A., Peach, R., Aruffo, A. & Stamenkovic, I. Interaction entre CD44 et l'hyaluronate est directement impliqué dans la régulation du développement tumoral. *J. Exp. Med.* 180, 53–66 (1994).

17. A. Zoltan-Jones, L. Huang, S. Ghatak & Toole, BP Hyaluronane élevé la production induit des propriétés mésenchymateuses et transformées dans les cellules épithéliales. *J. Biol. Chem.* 278, 45801–45810 (2003).

18. Zöller, M. CD44 : une cellule initiatrice de cancer peut-elle bénéficier d'une molécule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254–267 (2011).

19. Muller, S. et al. CD44 régule la plasticité épigénétique en médiant le fer endocytose. *Nat. Chim.* 12, 929–938 (2020).

20. McKee, CM et al. Les fragments d'hyaluronane (HA) induisent le gène de la chimiokine expression dans les macrophages alvéolaires. Le rôle de la taille HA et du CD44. *J. Clin. Invest.* 98, 2403-1243 (1996).

21. Kruidenier, L. et al. Un inhibiteur sélectif de la déméthylase jumonji H3K27 module la réponse pro-inflammatoire des macrophages. *Nature* 488, 404–408 (2012).

22. Saeed, S. et al. Programmation épigénétique du monocyte au macrophage différenciation et immunité innée entraînée. *Sciences* 345, 1251086 (2014).

23. Netea, MG et al. Immunité entraînée : un programme de mémoire immunitaire innée dans la santé et la maladie. *Sciences* 352, aaf1098 (2016).

24. Menke-van der Houven van Oordt, CW et al. Premier essai clinique de phase I chez l'homme du RG7356, un anticorps humanisé anti-CD44, chez les patients atteints de tumeurs solides avancées exprimant le CD44. *Oncotarget* 7, 80046–80058 (2016).
-
25. Madau, M. et al. Un acide hyaluronique doux et simple en un seul pot fonctionnalisation par terminaison de poly-(2-alkyl-2-oxazoline). *Polymère* 230, 124059 (2021).
-
26. Ren, M., Deng, B., Wang, JY, Liu, ZR et Lin, W. Une fluorescence à double émission sonde améliorée pour l'imagerie des ions cuivre(II) dans les lysosomes. *J. Mater. Chim. B* 3, 6746–6752 (2015).
-
27. Slotta, KH & Tschesche, R. A propos des biguanides, I. : Sur la constitution de Complexes de métaux lourds de biguanide. *environ. Société chimique allemande* 62, 1390-1398 (1929).
-
28. Zhu, M., L. Lu, Yang, P. & Jin, X. Bis(1,1-diméthylbiguanido)cuivre(II). octahydraté. *Acte. Crist.* E58, m217–m219 (2002).
-
29. Zhou, G. et al. Rôle de la protéine kinase activée par l'AMP dans le mécanisme de la metformine action. *J.Clin. Investir.* 108, 1167-1174 (2001).
-
30. Ge, EJ et al. Connecter le cuivre et le cancer : de la signalisation des métaux de transition à métalloplasie. *Nat. Rev. Cancer* 22, 102–113 (2022).
-
31. Wang, J. et al. Inhibition du trafic de cuivre humain par une petite molécule atténuée considérablement la prolifération des cellules cancéreuses. *Nat. Chim.* 7, 968–979 (2015).
-

32. Cui, L. et al. L'épuisement du cuivre mitochondrial supprime le sein triple négatif cancer chez la souris. *Nat. Biotechnol.* 39, 357–367 (2021).
-
33. Rodriguez, R., Schreiber, SL et Conrad, M. Cellules cancéreuses persistantes : dépendance au fer et la vulnérabilité à la ferroptose. *Mol. Cellule* 82, 728–740 (2022).
-
34. Cañeque, T., Müller, S. & Rodriguez, R. Visualisation de petites molécules biologiquement actives dans les cellules à l'aide de la chimie du clic. *Nat. Rév. Chem.* 2, 202-215 (2018).
-
35. Tornøe, CW, Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles en phase solide : [1,2,3]-triazoles par des cycloadditions 1,3-dipolaires régiospécifiques catalysées par le cuivre(I) d'alcynes terminaux à des azotures. *J. Org. Chim.* 67, 3057–3064 (2002).
-
36. Rostovtsev, VV, Green, LG, Fokin, VV & Sharpless, KB Un huisgen progressif processus de cycloaddition : « ligation » régiosélective catalysée par le cuivre(I) d'azotures et d'alcynes terminaux. *Angew. Chim. Int. Éd.* 41, 2596-2599 (2002).
-
37. Sletten, EM & Bertozzi, CR Chimie bioorthogonale : pêche à la sélectivité dans une mer de fonctionnalités. *Angew. Chim. Int. Éd.* 48, 6974–6998 (2009).
-
38. Tsvetkov, P. et al. Le cuivre induit la mort cellulaire en ciblant le cycle TCA lipoylé protéines. *Sciences* 375, 1254-1261 (2022).
-
39. Wang, L. et al. Cuivre(II) mitochondrial d'imagerie par fluorescence via sonde fluorogène photocontrôlable dans les cellules vivantes. *Chimie chinoise. Lett.* 28, 1965–1968 (2017).
-
40. Chan, PC & Kesner, L. Cuivre (II) oxydation catalysée par un complexe de NADH par le peroxyde d'hydrogène. *Biol. Trace Elem. Rés.* 2, 159–174 (1980).
-

41. Robbins, MH & Drago, RS Activation du peroxyde d'hydrogène pour l'oxydation par complexes de cuivre(II) . J. Chat. 170, 295–303 (1997).
-
42. Dai, Z., Ramesh, V. & Locasale, JW Le paysage métabolique en évolution de biologie de la chromatine et épigénétique. Nat. Rev.Genet. 21, 737–753 (2020).
-
43. Chua, RL et al. La gravité du COVID-19 est corrélée à l'immunité à l'épithélium des voies respiratoires interactions cellulaires identifiées par analyse unicellulaire. Nat. Biotechnol. 38, 970–979 (2020).
-
44. Pai, AA et al. Raccourcissement généralisé des régions 3' non traduites et augmentation l'inclusion d'exons sont des caractéristiques conservées au cours de l'évolution de l'immunité innée réponses à l'infection. PLoSGenet. 12, e1006338 (2016).
-
45. Fernandes, MC et al. Le profilage du double transcriptome des macrophages humains infectés par Leishmania révèle des signatures de reprogrammation distinctes. MBio 7, e00027-16 (2016).
-
46. Gonçalves, SM et al. Élimination phagosomale des reprogrammes de mélanine fongique métabolisme des macrophages pour favoriser l'immunité antifongique. Nat. Commun. 11, 2282 (2020).
-
47. Hoffmann, JA, Kafatos, FC, Janeway, CA & Ezekowitz, RA Perspectives phylogénétiques dans l'immunité innée. Sciences 284, 1313-1318.
-
48. Buras, JA, Holzmann, B. & Sitkovsky, M. Modèles animaux de septicémie : organiser. Nat. Rev.DrugDiscov. 4, 854–865 (2005).
-

49. Kulkarni, AS, Gubbi, S. & Barzilai, N. Avantages de la metformine pour atténuer la signes distinctifs du vieillissement. *Cellule Metab.* 32, 15–30 (2020).
-
50. Bharat, LP et al. La metformine améliore l'autophagie et normalise fonction mitochondriale pour soulager l'inflammation associée au vieillissement. *Cellule Metab.* 32, 44–55.e6 (2020).
-
51. Messaoudii, C., Boudier, T., Sanchez Sorzano, C. O. & Marco, S. TomoJ: logiciel de tomographie pour reconstruction tridimensionnelle en transmission microscopie électronique. *BMC Bioinf.* 8, 288–296 (2007).
-
52. Lechene, C. et al. Imagerie quantitative à haute résolution de mammifères et cellules bactériennes par spectrométrie de masse à isotopes stables. *J. Biol.* 5, 20 (2006).
-
53. Gräber, M. et al. Les désinfectants oraux inhibent les interactions protéine-protéine médiées par la protéine anti-apoptotique Bcl-xL et induisent l'apoptose dans les tumeurs orales humaines cellules. *Angew. Chim. Int. Éd. angl.* 52, 4487–4491 (2013).
-
54. Giguère, J.-B. et coll. Synthèse des rotaxanes [2] et [3] par Sonogashira couplage. *Tétraèdre Lett.* 50, 5497–5500 (2009).
-
55. Valle, FD & Romeo, A. Esters d'acide hyaluronique. Brevet américain US-4851521-A (1986).
-
56. Zhu, M., L. Lu, Yang, P. & Jin, X. Bis(1,1-diméthylbiguanido)cuivre(II). octahydraté. *Acta Crystallogr. E* 58, m217–m219 (2002).
-
57. Allouche, A.-R. Gabedit-Une interface utilisateur graphique pour la chimie computationnelle logiciel. *J. Comput. Chim.* 32, 174–182 (2011).
-

58. Lindorff-Larsen, K. et al. Amélioration des potentiels de torsion de la chaîne latérale pour l'Amber champ de force de la protéine ff99SB. *Protéines* 78, 1950–1958 (2010).
-
59. Stewart, JJ Optimisation des paramètres pour les méthodes semi-empiriques VI : plus modifications des approximations NDDO et ré-optimisation des paramètres. *J. Mol. Modèle.* 19, 1–32 (2013).
-
60. Klamt, A. & Schüürmann, G. COSMO : une nouvelle approche du blindage diélectrique dans solvants avec des expressions explicites pour l'énergie d'écran et son gradient. *J Chim. Soc. Perkins. Trans. 2*, 799–805 (1993).
-
61. Neese, F. Mise à jour logicielle : le système de programme ORCA, version 4.0. *Fils Calcul. Mol. Sci.* 8, e1327 (2018).
-
62. Stephens, PJ, Devlin, FJ, Chabalowski, CF & Frisch, MJ Calcul ab initio des spectres d'absorption vibratoire et de dichroïsme circulaire en utilisant la densité champs de force fonctionnels. *J.Phys. Chim.* 98, 11623–11627 (1994).
-
63. Zhao, Y. & Truhlar, DG La suite M06 de fonctionnelles de densité pour le groupe principal thermochimie, cinétique thermochimique, interactions non covalentes, excité états et éléments de transition : deux nouvelles fonctionnelles et des tests systématiques de quatre fonctionnelles de classe M06 et 12 autres fonctionnelles. *Théor. Chim. Acc.* 120, 215–241 (2007).
-
64. Becke, AD Un nouveau mélange de Hartree–Fock et des théories fonctionnelles de la densité locale. *J. Chem. Phys.* 98, 1372–1377 (1993).
-
65. Lee, C., Yang, W. & Parr, RG Développement de la corrélation Colle-Salvetti formule énergétique en une fonctionnelle de la densité électronique. *Phys. Rev. B* 37, 785–789 (1988).
-

66. Weigend, F. & Ahlrichs, R. Ensembles de base équilibrés de valence divisée, valence triple zêta et qualité de valence quadruple zêta pour H à Rn : conception et évaluation de la précision. Phys. Chim. Chim. Phys. 7, 3297 (2005).
-
67. Grimme, S., Ehrlich, S. & Goerigk, L. Effet de la fonction d'amortissement en dispersion théorie fonctionnelle de la densité corrigée. J. Comput. Chim. 32, 1456-1465 (2011).
-
68. Galvan-Garcia, EA, Agacino-Valdes, E, Franco-Perez, M & Gomez-Balderas, R. $[\text{Cu}(\text{HO}_2)_n]^{2+}$ complexes en phase de solution : une étude hiérarchique DFT. Théor. Chim. Acc. 136, 29 (2017).
-
69. Schäfer, A., Horn, H. & Ahlrichs, R. Base gaussienne contractée entièrement optimisée sets pour atomes Lito Kr. J. Chem. Phys. 97, 2571-2577 (1992).
-
70. Eichkorn, K., Weigen, F., Treutler, O. & Ahlrichs, R. Ensembles de base auxiliaires pour atomes de ligne et métaux de transition et leur utilisation pour approximer Coulomb potentiels. Théor. Chim. Acc. 97, 119-124 (1997).
-
71. Marenich, AV, Cramer, CJ & Truhlar, DG Modèle de solvation universel basé sur densité électronique du soluté et sur un modèle de continuum du solvant défini par la constante diélectrique de masse et tensions superficielles atomiques. J.Phys. Chim. B 113, 6378-6396 (2009).
-
72. Ribeiro, RF, Marenich, AV, Cramer, CJ & Truhlar, DG Utilisation de la phase en solution fréquences vibrationnelles dans les modèles de continuum pour l'énergie libre de solvation. J Phys. Chim. B 115, 14556-14562 (2011).
-
73. Viltard, M. et al. La signature métabolomique de l'extrême longévité : la taupe nue rats contre souris. 11 ans , 4783-4800 (2019).
-

74. Poulet, P., Carpentier, S. & Barillot, E. myProMS, un serveur web pour la gestion et la validation des données protéomiques basées sur la spectrométrie de masse. *Protéomique* 7, 2553-2556 (2007).
-
75. The, M., MacCoss, MJ, Noble, WS & Kall, L. Protéine rapide et précise fausse taux de découverte sur des ensembles de données protéomiques à grande échelle avec Percolator 3.0. *Confiture. Soc. Spectre de masse.* 27, 1719-1727 (2016).
-
76. Valot, B., Langella, O., Nano, E. & Zivy, M. MassChroQ : un outil polyvalent pour la masse quantification par spectrométrie. *Protéomique* 11, 3572–3577 (2011).
-
77. Liao, M. et al. Paysage unicellulaire des cellules immunitaires bronchoalvéolaires chez les patients avec la COVID-19. *Nat. Méd.* 26, 842–844 (2020).
-
78. Robinson, MD, McCarthy, DJ & Smyth, GK edgeR : un ensemble de bioconducteurs pour l'analyse d'expression différentielle des données numériques d'expression génique. *Bioinformatique* 26, 139-140 (2010).
-
79. Ritchie, ME et al. limma alimente les analyses d'expression différentielle pour le séquençage d'ARN et les études de microréseaux. *Nucleic Acids Res.* 43, e47 (2015).
-
80. Perez-Riverol, Y. et al. Les ressources de la base de données PRIDE en 2022 : un hub pour la masse preuves protéomiques basées sur la spectrométrie. *Nucleic Acids Res.* 50, D543–D552 (2022).

Remerciements

RRmerci J.-M. Lehn, S. Schreiber et R. Vale. Ce travail a été soutenu par le CNRS, l'INSERM, l'Université de Recherche PSL, l'Université Paris Saclay, l'École Polytechnique, l'Université de Bath, l'Université de Lille et l'Institut Pasteur (Lille). RR a été soutenu par le Conseil européen de la recherche dans le cadre du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne (accord de subvention n° 647973), Fondation

Charles Defforey-Institut de France, Region IdF for NMR infrastructure, Ligue Contre le Cancer et les Dames de Pompadour. GK a été soutenu par l'ANR Grant Wilsonmed et le LabEx Immuno-Oncologie (ANR-18-IDEX-0001). DA a été prise en charge par les dossiers FHU Sepsis et Programme d'Investissements d'Avenir ANR-18-RHUS-0004-RHU. La plateforme ICP-MS de l'Institut de Physique du Globe de Paris est soutenue par le programme pluridisciplinaire IPGP PARI et la Région IdF (convention de subvention SESAME n° 12015908). Ce travail a obtenu l'accès aux ressources HPC du CINES dans le cadre de l'allocation 2020-A0070810977 faite par GENCI, le service Balena High Performance Computing (HPC) de l'Université de Bath, le PICT-IbiSA@BDD Imaging Facility de l'Institut Curie, membre de la France- Infrastructure nationale de recherche BioImagerie (ANR-10-INBS-04), la plateforme ICGex NGS de l'Institut Curie (ANR-10-INBS-09-08, INCa-DGOS-465, INCa-DGOS-Inserm_12554), GenoToul ANEXPLO Animal Installations Niveau 3 et TRI de l'IPBS (Investissement d'Avenir et Fondation Bettencourt), la plateforme de spectrométrie de masse soutenue par la Région Ile-de-France (N°EX061034) et l'ITMO Cancer d'Aviesan et l'INCa sur fonds gérés par l'INSERM (N°21CQ016-00), et la plateforme de cytométrie de l'Institut Curie. Nous remercions P Benaroch, J.-L. Guerquin-Kern, M. Plays, J. Sampaio Lopes, D. Guillemot, O. Delattre et O. Neyrolles pour le soutien.

Informations sur l'auteur

Ces auteurs ont contribué à parts égales : Stéphanie Solier, Sebastian Müller, Tatiana Cañeque, Antoine Versini

Auteurs et affiliations

Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Institut Curie, CNRS, INSERM, PSL Research University, Paris, France

Stéphanie Solier, Sebastian Müller, Tatiana Cañeque, Antoine Versini, Fabien Sindikubwabo, Leeroy Baron, Christine Gaillet, Alain Puisieux & Raphaël Rodríguez

Paris Saclay University, UVSQ, INSERM, 21, Montigny-le-Bretonneux, France

Arnaud Mansart, Laila Emam & Djillali Annane

CBIO-Centre for Computational Biology, Institut Curie, INSERM, Mines ParisTech, Paris, France

Pierre Gestraud & Nicolas Servant

Département de chimie, Université de Bath, Bath, Royaume-Uni

G. Dan Panto

Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, CNRS, Paris Saclay University, Orsay, France

Vincent Gandon

Laboratoire de Chimie Moléculaire, CNRS, Ecole Polytechnique, Institut Polytechnique de Paris, Palaiseau, France
Vincent Gandon

Institut Curie, Université de recherche PSL, Paris, France
Ting-Di Wu

Centre d'imagerie multimodale, Université Paris Saclay, CNRS, INSERM, Orsay, France
Ting-Di Wu

CurieCoreTech Mass Spectrometry Proteomic, Institut Curie, Université de recherche PSL, Paris, France
Florent Dingli & Damarys Loew

Plateforme de séquençage nouvelle génération ICGex, Institut Curie, Université de recherche PSL, Paris, France
Sylvain Baulande

Plateformes Métabolomique et Biologie Cellulaire, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
Sylvère Durand & Guido Kroemer

Université de Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, CIIL, Lille, France
Valentin Sencio, Cyril Robil & François Trottein

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France
David Péricat, Emmanuelle Näser, Céline Cougoule & Etienne Meunier

Plateforme de Cytométrie et Imagerie, Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, Toulouse, France
Emmanuelle Naser

Institut Curie, INSERM, Université de recherche PSL, Paris, France
Anne-Laure Bègue, Héléne Salmon & Nicolas Manel

Département d'oncologie médicale, Institut Curie, Université de recherche PSL, Paris, France
Sarah Watson

Peter MacCallum Cancer Center et Sir Peter MacCallum Department of Oncology, Melbourne, Victoria, Australie
Mark A.Dawson

Centre de recherche sur le cancer, Université de Melbourne, Melbourne, Victoria, Australie
Mark A.Dawson

Centre de Recherche des Cordeliers, University of Paris, Sorbonne University, INSERM, Institut Universitaire de France, Paris, France
Guido Kroemer

Institut du Cancer Paris CARPEM, Department of Biology, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France
Guido Kroemer

Department of Intensive Care, Hôpital Raymond Poincaré, AP-HP, Garches, France
Djillali Annane

Contributions

RR a conceptualisé l'étude et dirigé la recherche. RR, SM, SS et TC ont conçu les expériences et analysé les données. Sauf indication contraire, SM et SS ont réalisé les expériences. TC, AV, LB et CG ont effectué des tests chimiques

synthèse et chimie analytique. GDP et VG assistés par modélisation moléculaire.

T.-DW a assisté à l'imagerie NanoSIMS. SD et GK ont participé à la métabolomique basée sur la spectrométrie de masse. FS, FD et DL ont effectué une protéomique basée sur la spectrométrie de masse. FS, PG, SB et NS ont effectué le séquençage Solexa/Illumina et la bioinformatique. AM, LE et DA ont établi les modèles précliniques de septicémie et réalisé l'isolement des SPM. VS, CR, FT, DP, EN, CC et EM ont effectué une infection par le SRAS CoV-2 et un isolement des macrophages alvéolaires. RR et SM ont écrit l'article. Tous les auteurs ont contribué aux ébauches de l'article.

auteur correspondant

Correspondence to [Raphaël Rodriguez](#) _____

Déclarations éthiques

Intérêts concurrents

L'Institut Curie et le CNRS ont déposé des brevets sur la famille de composés LCC et leur utilisation thérapeutique. Brevets : WO 2019/233982, déposé le 4 juin 2019 ; PCT/EP2021/082073, déposé le 18 novembre 2021, WO 2021/233962, déposé le 19 mai 2021.

Examen par les pairs

Informations sur l'examen par les pairs

Nature remercie Donita Brady et les autres examinateurs anonymes pour leur contribution à l'examen par les pairs de ce travail. [Les rapports des pairs examinateurs](#) sont disponibles.

Informations Complémentaires

Note de l'éditeur Springer Nature reste neutre en ce qui concerne les revendications juridiques dans les cartes publiées et les affiliations institutionnelles.

Chiffres et tableaux de données étendus

[ExtendedData Fig. 1CD44 médie l'absorption des métaux dans les macrophages inflammatoires.](#)

a, cytométrie en flux des marqueurs de surface cellulaire dans le MDM. Monocytes traités comme indiqué pour obtenir des états pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. b, cytométrie en flux des marqueurs de surface cellulaire dans le MDM. Données représentatives de n = 13 donneurs. c, images de microscopie à fond clair de MDM. Barre d'échelle, 20 µm. Observations morphologiques représentatives de n = 128 donneurs. d, ICP-MS de métaux cellulaires dans MDM (n = 9 donneurs). e, ICP-MS de métaux cellulaires dans aMDM dans des conditions de knockdown indiquées gènes (n = 6 donneurs).f, Western blots de transporteurs de métaux cellulaires dans aMDM sous conditions d'inactivation des gènes indiqués (n = 4 donneurs). g, Western blots de transporteurs de métaux cellulaires dans aMDM dans des conditions d'inactivation de CD44 (n = 6 donneurs). Pour d, f et g test de Mann-Whitney bilatéral. Pour e, test de Kruskal-Wallis avec post-test de Dunn. Boîtes à moustaches : les boîtes représentent l'intervalle interquartile et la médiane et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Chaque point coloré représente un donneur distinct pour un panel donné.

[Données source](#)

[ExtendedData Fig. 2CD44 médie l'absorption des métaux dans les macrophages inflammatoires.](#)

a, ICP-MS de métaux cellulaires dans aMDM traité avec un anticorps anti-CD44 RG7356 lors de l'activation (n = 7 donneurs). b, ICP-MS de métaux cellulaires dans aMDM supplémenté avec HA (0,6-1 MDa) ou perméthylé (méth-)HA lors de l'activation (n = 6 donneurs). c, Western blots de hyaluronane synthases (HAS) (n = 6 donneurs) et ATP7A/B (n = 8 donneurs) dans MDM. d, Microscopie à fluorescence d'une sonde lysosomale de cuivre (II) (Lys Cu) dans l'aMDM dans des conditions d'inactivation de CD44 (n = 5 donneurs). e, Microscopie à fluorescence de CTR2 et Lamp2 dans aMDM (n = 4 donneurs).f, Microscopie à fluorescence d'une sonde lysosomale de cuivre (II) (Lys-Cu) dans aMDM dans des conditions d'inactivation de CTR2 (n = 5 donneurs). Pour d-f, barres d'échelle, 10 µm. Pour a, c, d et f test de Mann Whitney bilatéral. Pour b, test de Kruskal-Wallis avec post-test de Dunn. Boîtes à moustaches : les boîtes représentent la plage interquartile et la médiane, et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Chaque point coloré représente un donneur distinct pour un panel donné.

[Données source](#)

ExtendedData Fig. 3 Développement d'une petite molécule inactivatrice de cuivre mitochondrial(II).

a, Cytométrie en flux de MDM traité avec ATTM (10 μ M, n = 5 donneurs), D-Pen (250 μ M, n = 5 donneurs), EDTA (500 μ M, n = 5 donneurs) ou Trien (200 μ M, n = 5 donneurs). b, Analyse structurale de complexes de cuivre(II) à base de biguanides par modélisation moléculaire.

Les vues de dessus et de côté mettent en évidence des géométries distinctes de Cu(Met), Cu-LCC-12 et Cu-LCC-4,4. c, HRMS de Cu(Met) et Cu-LCC-4,4. d, HRMS de LCC-12 en présence de métaux comme indiqué. e, spectres d'absorbance UV de LCC-12 (5 μ M) titré avec une solution de cuivre(II). f, Photo de aq. solutions de Met, LCC-12, CuCl et mélanges correspondants. g, Western blots d'AMPK α et d'AMPK α phosphorylée (p AMPK α) dans du MDM traité avec LCC-12 ou Met (n = 6 donneurs). Pour a et g Kruskal-Wallis

test avec le post-test de Dunn. Boîtes à moustaches : les boîtes représentent l'intervalle interquartile et la médiane, et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Chaque point de couleur représente un donneur distinct pour un panel donné.

[Données source](#)

Données étendues Fig.4 Le ciblage du cuivre mitochondrial (II) interfère avec la plasticité cellulaire.

a, Cytométrie en flux de CD44 dans les cellules dendritiques (DC)(n = 6 donneurs), non activées (naDC) et activées (aDC), cellules T CD4 (CD4)(n = 6 donneurs), non activées (naCD4) et activées (aCD4), lymphocytes T CD8⁺ (CD8)(n = 6 donneurs), non activés (naCD8) et activés (aCD8), macrophages anti-inflammatoires CSF1/IL-4 (n = 6 donneurs), non activés (naMDM2) et activés (aMDM2), neutrophiles (N) (n = 6 donneurs), non activés (naN) et activés (aN). b, cytométrie en flux des marqueurs de surface cellulaire dans les cellules immunitaires traitées avec LCC-12 lors de l'activation. c, cellule humaine primaire non à petites cellules cancéreuses pulmonaires circulantes traitées comme indiqué. Gauche : cytométrie en flux de CD44. Milieu : ICP-MS de cuivre cellulaire (n = 5 expériences biologiques indépendantes). À droite : Western blots de marqueurs EMT. d, cellules cancéreuses pancréatiques murines traitées comme indiqué. Gauche : cytométrie en flux de CD44. Milieu : ICP-MS de cuivre cellulaire (n = 4 expériences biologiques indépendantes). À droite : Western blots de marqueurs EMT. Pour b-d recto-verso

Test de Mann-Whitney. Boîtes à moustaches : les boîtes représentent la plage interquartile et la médiane, et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Chaque point coloré représente un donneur distinct pour un type cellulaire donné.

[Données source](#)

ExtendedData Fig. 5 Détection d'un pool de cuivre(II) dans les mitochondries.

a, Structure moléculaire de l'isotopologue N, C-LCC-12^{15,13}. b, Image NanoSIMS de N et ¹⁹⁷Au dans aMDM de n = 1 donneur. c, Microscopie à fluorescence de LCC-12,4 marqué (100 nM) dans aMDM. Marquage en cellule réalisé sans ajout de cuivre(II) et en utilisant le LCC-12 comme compétiteur. Représentant de n = 3 donneurs. d, ICP-MS de métaux dans les mitochondries de MDM (n = 6 donneurs). e, Comparaison du contenu total en métal dans les cellules et mitochondries de MDM déterminées par ICP-MS. f, ICP-MS de métaux dans des noyaux isolés de MDM (n = 6 donneurs). g, ICP-MS de métaux dans le réticulum endoplasmique (RE) isolé de MDM (n = 6 donneurs). h, ICP-MS de la teneur totale en cuivre cellulaire dans le MDM traité avec LCC-12 (n = 6 donneurs). i, ICP-MS de cuivre mitochondrial dans du MDM traité avec LCC-12 (n = 6 donneurs). j, Cytométrie en flux d'une sonde de cuivre (II) mitochondriale (M-2) dans du MDM traité avec LCC-12 (n = 10 donneurs). k, transferts Western de transporteurs de métaux mitochondriaux dans MDM (n = 8 donneurs). l, m, n, Microscopie à fluorescence de LCC-12,4 marqué dans aMDM dans des conditions d'inactivation du gène comme indiqué (n = 4 donneurs). o, Haut : Structure of trientine alcyne. En bas : Photo d'aq. solutions de trientine alcyne, CuSO et mélanges correspondants. p, Microscopie à fluorescence de l'alcyne trientine marqué dans l'aMDM. Pour b, c, l - n, p barre d'échelle, 10 µm. Pour c test t bilatéral non apparié, représentatif de n = 3 donneurs. Moyenne ± sd Pour d, f, g, k, l - n, test de Mann-Whitney bilatéral. Pour h - j test de Kruskal-Wallis avec post-test de Dunn. Boîtes à moustaches : les boîtes représentent la plage interquartile et la médiane, et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Chaque point coloré représente un donneur distinct pour un panneau donné.

[Données source](#)

ExtendedData Fig.6Copper(II) régule le cycle redox NAD(H).

a, spectres RMN H du NADH (noir) et des produits de réaction du NADH avec HO⁺ 2 2
 après 1 h à 37 °C, spectres enregistrés à 298 K en DO (rouge). b, Réaction de MDHNA avec H O dans des
 conditions catalysées par le cuivre (II) et sans cuivre pour donner respectivement du MNA ou un produit d'époxydation.
 Les masses d'ions moléculaires détectés par spectrométrie de masse sont indiquées. c, Cohérence quantique
 unique hétéronucléaire (HSQC)
 Spectres RMN de MDHNA et de son produit d'époxydation. Les étoiles rouges marquent les signaux RMN H¹ et
 C de la double liaison la plus réactive vis-à-vis de HO et celle du produit époxyde correspondant. Les
 étoiles bleues marquent les signaux RMN H et C de la double liaison la moins réactive vis-à-vis de HO. Les boîtes
 bleues montrent les corrélations H-C HSQC de la 1 13
 double liaison la moins réactive. Les cases rouges montrent les corrélations H- C HSQC les plus
 double liaison réactive et époxyde correspondant. d, spectres RMN H du NADH, de l'imidazole et du cuivre(II)
 (noir), du NAD en présence d'imidazole et de cuivre(II)
 (bleu), le produit de la réaction du NADH avec HO en présence d'imidazole et
 cuivre(II) après 1 h à 25 °C, spectres enregistrés à 298 K dans du DO tamponné (pD 8,4) (vert). e, Profil
 d'énergie libre (ΔG , kcal/mol) de la réaction de transfert d'hydrogène médiée par [(imidazole)Cu(HO)](II) du
 MDHNA vers HO. Distances sélectionnées en Å. Gratuit 2 2
 profil énergétique (ΔG , kcal/mol) de la réaction de transfert de H sans cuivre de MDHNA à HO. Distances
 sélectionnées en Å. f, Cu(Met) optimisé, MDHNA, HO et H O. g, Concentrations de cuivre et de NADH dans les
 cellules et dans le système sans cellule utilisé à la Fig. 3f. h, Quantification du lactate extracellulaire produit par
 MDM traité avec LCC-12 ou Met (n = 5 donneurs). i, Quantification du glycéraldéhyde 3-phosphate (GA3P) dans le
 MDM
 traités avec LCC-12 ou Met (n = 5 donneurs). Pour h et i test de Kruskal-Wallis avec Dunn
 post-test. Boîtes à moustaches : les boîtes représentent la plage interquartile et la médiane, et les moustaches
 indiquent les valeurs minimales et maximales. Chaque point coloré représente un élément distinct
 donneur pour un panel donné.

[Données source](#)

[ExtendedData Fig. 7Analyse comparative des transcriptomes des macrophages inflammatoires.](#)

a, analyse en composantes principales (ACP) de l'ARN-seq comparant naMDM (n = 10 donneurs) et
 aMDM (n = 10 donneurs) avec MDM exposé à *Salmonella typhimurium* (n = 32 donneurs) vs témoin (n = 32
 donneurs), macrophages des fluides bronchoalvéolaires

des individus COVID-19 modérés (n = 3 donneurs) et sévères (sCOVID, n = 6 donneurs) vs témoin (n = 4 donneurs), MDM exposé à *Leishmania major* (n = 5 donneurs) vs témoin (n = 6 donneurs) et MDM exposé à *Aspergillus fumigatus* (n = 3 donneurs) vs témoin (n = 3 donneurs). b, analyses à terme GO des gènes régulés à la hausse dans le MDM exposé à *Salmonella typhimurium* (n = 32 donneurs) vs témoin (n = 32 donneurs), sCOVID (n = 6 donneurs) vs témoin (n = 4 donneurs), *Leishmania major* (n = 5 donneurs) vs témoin (n = 6 donneurs) et *Aspergillus fumigatus* (n = 3 donneurs) vs témoin (n = 3 donneurs). c, analyses ARN-seq de l'expression génique dans les MDM exposés à *Salmonella typhimurium* (n = 32 donneurs) vs contrôle (n = 32 donneurs), sCOVID (n = 6 donneurs) vs contrôle (n = 4 donneurs), *Leishmania major* (n = 5 donneurs) vs contrôle (n = 6 donneurs) et *Aspergillus fumigatus* (n = 3 donneurs) vs contrôle (n = 3 donneurs). Les gènes de signature inflammatoire sont mis en évidence. Lignes pointillées, valeurs P ajustées = 0,05. d, analyses ARN-seq de l'expression génique chez les MDM exposés à *Salmonella typhimurium* (n = 32 donneurs) vs contrôle (n = 32 donneurs), sCOVID (n = 6 donneurs) vs contrôle (n = 4 donneurs), *Leishmania major* (n = 5 donneurs) vs contrôle (n = 6 donneurs) et *Aspergillus fumigatus* (n = 3 donneurs) vs contrôle (n = 3 donneurs). Les gènes codant pour les déméthylases fer-dépendantes et les acétyl transférases sont mis en évidence. Lignes pointillées, valeurs P ajustées = 0,05. Pour b – d, l'expression différentielle des gènes a été évaluée avec le cadre limma/voom. ALLER l'enrichissement a été évalué avec la méthode enrichGO de clusterProfiler. Valeurs P ont été corrigés pour les tests multiples avec la procédure de Benjamini-Hochberg.

[ExtendedData Fig.8 Le cuivre\(II\) mitochondrial régule les états épigénétiques et les programmes de transcription des macrophages inflammatoires.](#)

a, Protéomique basée sur la spectrométrie de masse quantitative du MDM (n = 8 donneurs). b, Western blots représentatifs (en haut) de modificateurs épigénétiques identifiés par ARN-seq dans aMDM et quantifications correspondantes (en bas)(n = 6–8 donneurs). c, Les gènes codant pour les déméthylases et les acétyl-transférases dépendantes du fer qui se sont avérés régulés positivement dans l'aMDM sont répertoriés avec les substrats putatifs et les produits de modifications post-traductionnelles (PTM). d, Quantifications par microscopie à fluorescence des marques de méthyle et d'acétyle de l'histone H3 dans le MDM. Les quantifications représentent l'aMDM normalisé par rapport au naMDM. Au moins 50 cellules ont été quantifiées par donneur par condition (n = 5 à 11 donneurs). e, la corrélation du diagramme de dispersion d'un donneur représentatif de CHIP-seq lit le nombre de marques d'histones dans les gènes par rapport à l'ARN-seq du gène

transcrits dans MDM (n = 10 donneurs).f, pistes ChIP-seq de gènes sélectionnés impliqués dans inflammation dans le MDM. Pour b et d, test de Mann-Whitney bilatéral. Boîtes à moustaches : les boîtes représentent la plage interquartile et la médiane, et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Chaque point coloré représente un donneur distinct pour un panel donné.

[Données source](#)

[ExtendedData Fig.9Le cuivre mitochondrial\(II\) régule les états épigénétiques et les programmes de transcription des macrophages inflammatoires.](#)

a, Western blots représentatifs (en haut) des protéines impliquées dans l'inflammation dans le MDM traité avec LCC-12 et quantifications correspondantes (en bas) (n = 8 donneurs). b, Dosage immunologique des cytokines sécrétées par le MDM traité au LCC-12 lors de l'activation (n = 6 donneurs). c, PCA de RNA-seq comparant naMDM (n = 10 donneurs), aMDM (n = 10 donneurs) et MDM traité avec LCC-12 lors de l'activation (n = 5 donneurs). d, Quantifications par microscopie à fluorescence des marques méthyle et acétyle de l'histone H3 dans le MDM traité avec LCC-12. Les quantifications ont été normalisées par rapport au naMDM. Au moins 50 cellules ont été quantifiées par donneur par condition (n = 5–7 donneurs). e, Nuage de points corrélation d'un donneur représentatif de ChIP-seq lit le nombre de marques d'histones dans les gènes par rapport à l'ARN-seq des transcrits de gènes dans aMDM (n = 10 donneurs) et MDM traité avec LCC-12 pendant l'activation (n = 5 donneurs).f, ChIP -seq pistes de gènes sélectionnés impliqués dans l'inflammation dans le MDM. g, Western blots de protéines impliquées dans l'inflammation dans l'aMDM dans des conditions d'inactivation de SOD2. h, Western blots de protéines impliquées dans l'inflammation dans l'aMDM dans des conditions d'inactivation de SLC25A3. i, cytométrie en flux de type sauvage (WT) et CD44 knock-out (KO) aMDM. Stratégie de déclenchement voir [Informations supplémentaires](#). j, Western blots de protéines de transport de métaux dans WT et CD44-KO aMDM chez n = 1 donneur. k, Western blots de protéines impliquées dans inflammation et marques d'histones dans WT aMDM et CD44-KO aMDM pour n = 3 donneurs. H3 est un témoin de traitement d'échantillon. Pour a et d Test de Kruskal-Wallis avec post-test de Dunn. Pour b, g et h test de Mann-Whitney bilatéral. Boîtes à moustaches : les boîtes représentent l'intervalle interquartile et la médiane, et les moustaches indiquent les valeurs minimales et maximales. Chaque point coloré représente un donneur distinct pour un panel donné.

[Données source](#)

ExtendedData Fig. 10 L'inactivation pharmacologique du cuivre mitochondrial (II) atténue l'inflammation in vivo.

a, Western blots d'effecteurs de signalisation du cuivre dans les SPM de souris traitées avec du LPS. Les macrophages de plusieurs souris ont été regroupés (4 à 7 souris par condition). b, Western blots d'effecteurs de signalisation de cuivre dans des SPM de souris soumises à CLP. Les macrophages de plusieurs souris ont été regroupés (7 à 8 souris par condition). H3 est un témoin de traitement d'échantillon. c, Western blots d'effecteurs de signalisation du cuivre dans les AM de souris K18-hACE2 infectées par le SRAS-CoV-2. Les macrophages de plusieurs souris ont été regroupés (10 souris par condition). H3 est un témoin de traitement d'échantillon. d, température corporelle moyenne des souris traitées comme indiqué (n = 6 à 9 souris par groupe). e, analyse à terme GO des gènes sous-exprimés dans les tissus pulmonaires de souris K18-hACE2 infectées par le SRAS-CoV-2 traitées avec LCC-12 (0,5 mg/kg). f, analyse ARN-seq de l'expression génique dans les tissus pulmonaires du SRAS-CoV -2 souris K18-hACE2 infectées traitées avec LCC-12 (0,5 mg/kg)(n = 8 souris par groupe).

Gènes de signature inflammatoire mis en évidence. Lignes pointillées, valeur P ajustée = 0,05. g,

Illustration de la signalisation en cuivre. La plasticité cellulaire implique une régulation positive de la cellule

le marqueur de surface CD44, qui médie l'endocytose des hyaluronates liés au métal. En présence de cuivre (II),

le NADH réagit avec HO pour reconstituer le NAD dans les mitochondries, un cofacteur ⁺

enzymatique impliqué dans la biosynthèse de l' α KG et de l'acétyl CoA. Ces co-substrats de déméthylases et

d'acétyl-transférases dépendantes du fer sont nécessaires à la programmation épigénétique et transcriptionnelle

de l'inflammation et à la régulation de la plasticité cellulaire. L'inactivation pharmacologique du cuivre (II)

mitochondrial bloque le cycle redox du NAD (H), conduisant à des états épigénétiques et des profils

transcriptionnels distincts. Le ciblage du cuivre(II) interfère avec la plasticité cellulaire dans le système

immunitaire

et les cellules cancéreuses. Pour une stratégie de déclenchement a - c des SPM et des AM, voir [Méthodes](#) et

[Information supplémentaire](#). Pour d ANOVA à 2 facteurs. Valeurs moyennes \pm sem Pour e et f, l'expression

différentielle des gènes a été évaluée avec le cadre limma/voom. ALLER

l'enrichissement a été évalué avec la méthode enrichGO de clusterProfiler. Valeurs P

ont été corrigés pour les tests multiples avec la procédure de Benjamini-Hochberg.

[Données source](#)

Information supplémentaire

[Information supplémentaire](#)

Ce fichier contient les légendes des tableaux supplémentaires ; séquences pour l'interférence ARN et expériences d'édition du génome ; stratégies de synchronisation par cytométrie en flux ; transferts Western complets ; et les spectres RMN.

[RapportRésumé](#)

[PeerReviewFile](#)

[Tableau supplémentaire 1](#)

[Tableau supplémentaire 2](#)

[Tableau supplémentaire 3](#)

[Tableau supplémentaire4](#)

[Tableau supplémentaire 5](#)

[Tableau supplémentaire6](#)

[Tableau supplémentaire 7](#)

[Tableau supplémentaire8](#)

[Tableau supplémentaire9](#)

[Tableau supplémentaire 10](#)

[Tableau supplémentaire 11](#)

[Tableau supplémentaire 12](#)

Données source

[SourceDonnées Fig. 1](#)

[SourceDonnées Fig. 2](#)

[SourceDonnées Fig. 3](#)

[SourceDonnées Fig. 5](#)

[SourceData Données étendues Fig. 1](#) —

[SourceData Données étendues Fig. 2](#) —

[SourceData Données étendues Fig. 3](#) —

[SourceData Données étendues Fig.4](#) —

[SourceData Données étendues Fig. 5](#) —

[SourceDonnéesDonnées étendues Fig.6](#) —

[SourceData Données étendues Fig.8](#) —

[SourceDonnéesDonnées étendues Fig.9](#) —

[Données source Données étendues Fig. 10](#) —

Droits et autorisations

Libre accès Cet article est sous licence Creative Commons Attribution 4.0

Licence internationale, qui permet l'utilisation, le partage, l'adaptation, la distribution et la reproduction sur n'importe quel support ou format, tant que vous donnez le crédit approprié à l'auteur ou aux auteurs originaux et à la source, fournissez un lien vers la licence Creative Commons et indiquez si des modifications ont été faites. Les images ou tout autre matériel tiers dans cet article sont inclus dans la licence Creative Commons de l'article, sauf indication contraire sinon dans une ligne de crédit au matériel. Si le matériel n'est pas inclus dans l'article licence Creative Commons et que votre utilisation prévue n'est pas autorisée par la réglementation légale ou dépasse l'utilisation autorisée, vous devrez obtenir l'autorisation directement du titulaire du droit d'auteur. Pour voir une copie de cette licence, visitez

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> —

[Réimpressions et autorisations](#)

À propos de cet article

Citer cet article

Solier, S., Müller, S., Cañeque, T. et al. Une voie de signalisation du cuivre médicamenteuse qui pilote l'inflammation. *Nature* (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06017-4>

Reçu

21 mars 2022

Accepté

27 mars 2023

Publié

26 avril 2023

EST CE QUE :

<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06017-4>

Partagez cet article

Toute personne avec qui vous partagez le lien suivant pourra lire ce contenu :

[Obtenir un lien partageable](#)

Fourni par l'initiative de partage de contenu Springer Nature SharedIt

Sujets [Signalisation cellulaire](#)

• [Découverte de médicaments](#)

• [Épigénétique](#)

• [Inflammation](#)

• [Métaux](#)

Nature (Nature) ISSN 1476-4687 (en ligne) ISSN 0028-0836 (imprimé)